



Tesis Doctoral Propuesta para Mención Internacional:

“Estudio del hígado y líquido peritoneal en fases tempranas de ovejas infectadas experimentalmente con *Fasciola hepatica*”

“Study of the liver and peritoneal fluid of sheep in early stages of experimental infection with *Fasciola hepatica*”

Tesis presentada por María Teresa Ruiz Campillo para optar al grado de Doctora por la Universidad de Córdoba.

Programa de Doctorado de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias.

Bajo la dirección del Dr. José Pérez Arévalo y la codirección de la Dra. Verónica María Molina Hernández y el Dr. Rafael Zafra Leva.

TITULO: *Estudio del hígado y líquido peritoneal en fases tempranas de ovejas infectadas experimentalmente con Fasciola hepatica*

AUTOR: *María Teresa Ruiz Campillo*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Estudio del hígado y líquido peritoneal en fases tempranas de ovejas infectadas experimentalmente con *Fasciola hepatica*.

DOCTORANDO/A: María Teresa Ruiz Campillo

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

En la presente Tesis Doctoral se ha realizado un estudio del hígado y líquido peritoneal en las fases tempranas de la infección experimental con *Fasciola hepatica in vivo* en ovejas. Para el desarrollo de la Tesis ha sido necesario realizar dos experiencias, Experiencia 1 y Experiencia 2, en cada una de las cuales se utilizaron 25 ovejas de 8 meses de edad divididas en 5 grupos y sacrificadas a los 1, 3, 9 y 18 días post-infección, con un quinto grupo como control no infectado. Con muestras obtenidas del Experimento 1, se llevó a cabo un análisis de enzimas hepáticas, la determinación de la expresión génica de citoquinas en leucocitos peritoneales, el análisis proteómico del líquido peritoneal ovino mediante espectrofotometría de masas y el estudio inmunohistoquímico de muestras de hígado para detección de anticuerpos anti-periostina y anti-VCAM-1. Estos análisis fueron realizados en Queen's University (Belfast, Reino Unido), donde la doctoranda realizó varias estancias, de una duración total de 11 meses, comprendidas entre los años 2014 y 2017, en colaboración con la Dra. Verónica Molina Hernández. Los resultados fueron publicados en la revista **Scientific Reports (Nature)**, 2017, 7, 1-14. Además, con muestras del líquido peritoneal tanto del Experimento 1 como del 2, se realizó un estudio inmunocitoquímico en la Universidad de Córdoba para determinar la expresión de una serie marcadores de superficie de macrófagos: CD68, CD14, CD206, iNOS; de células dendríticas: CD83; y de células presentadoras de antígenos (excluyéndose linfocitos): MHC-II. Los resultados obtenidos de este ensayo inmunocitoquímico con las muestras del Experimento 2 fueron publicados en la revista **Veterinary Parasitology**, 2018, 257, 34-39.

Los resultados obtenidos en estos trabajos y en la presente Tesis Doctoral describen, por primera vez, la composición del líquido peritoneal en ovejas infectadas en fases tempranas con *F. hepatica* y la expresión de marcadores de superficie de leucocitos peritoneales. Conocer el mecanismo de acción del parásito en su migración hacia el hígado y la dinámica de la respuesta inmunitaria por parte del hospedador frente a la infección es crucial para poder diseñar tratamientos eficaces frente a la infección, que eviten la instauración del parásito a nivel hepático.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 18 de Julio de 2018

Fdo.: José Pérez Arévalo

Firma del/de los director/es

Fdo.: Verónica Molina Hernández

Fdo.: Rafael Zafra Leva

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	11
ABREVIATURAS.....	19
RESUMEN.....	25
SUMMARY.....	33
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	39
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	51
2.1. ETIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN.	51
2.2. CICLO BIOLÓGICO.	56
2.3. PATOLOGÍA Y PATOGENIA.	59
2.3.1. LESIONES.	65
2.3.1.1. LESIONES EN HÍGADO.....	65
2.3.1.1.1. LESIONES EN LA FASE PARENQUIMATOSA O PERIODO MIGRATORIO AGUDO	67
2.3.1.1.1.1. LESIONES MACROSCÓPICAS.....	67
2.3.1.1.1.2. LESIONES MICROSCÓPICAS.	69

2.3.1.1.2. LESIONES EN LA FASE BILIAR O PERIODO BILIAR CRÓNICO.....	71
2.3.1.1.2.1. LESIONES MACROSCÓPICAS.....	71
2.3.1.1.2.2. LESIONES MICROSCÓPICAS.....	71
2.3.1.1.3. LESIONES EN NÓDULOS LINFÁTICOS.....	73
2.3.2. ALTERACIONES BIOPATOLÓGICAS.....	74
2.3.2.1. ANEMIA.....	74
2.3.2.2. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	74
2.3.2.3. ENZIMAS HEPÁTICAS.....	75
2.4. INMUNOLOGÍA EN LA INFECCIÓN POR <i>F. hepatica</i>	78
2.4.1. INTRODUCCIÓN.....	78
2.4.2. RESPUESTA INMUNITARIA NATURAL O INNATA.....	79
2.4.3. RESPUESTA INMUNITARIA ADQUIRIDA O ADAPTATIVA.....	87
2.4.3.1. INMUNIDAD HUMORAL (LINFOCITOS B).....	88
2.4.3.2. INMUNIDAD CELULAR (LINFOCITOS T).....	92
2.4.3.2.1. LINFOCITOS T $\alpha\beta$ + o TCR-2.....	92
2.4.3.2.1.1. SUBTIPOS DE LINFOCITOS T COLABORADORES (TH1, TH2 Y TH17) Y SU PAPEL EN INFECCIONES POR HELMINTOS Y POR <i>F. hepatica</i>	93

2.4.3.2.2. LINFOCITOS T γ δ + o TCR-1.....	102
2.5. DESARROLLO DEL CONCEPTO DE ACTIVACIÓN DEL MACRÓFAGO.....	103
2.5.1. PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS M2 EN INFECCIONES POR HELMINTOS.....	108
2.5.2. ACTIVACIÓN CLÁSICA (M1) Y ALTERNATIVA (M2) DEL MACRÓFAGO Y PAPEL EN LA INFECCIÓN POR <i>F. hepatica</i>	111
2.6. APLICACIÓN DE LAS TECNOLOGÍAS “ÓMICAS” EN LA INFECCIÓN POR <i>F. hepatica</i>	113
2.6.1. INTRODUCCIÓN.....	113
2.6.2. APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA GENÓMICA EN LA INFECCIÓN POR <i>F. hepatica</i>	118
2.6.3. APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA TRANSCRIPTÓMICA EN LA INFECCIÓN POR <i>F. hepatica</i>	118
2.6.4. APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA PROTEÓMICA EN LA INFECCIÓN POR <i>F. hepatica</i>	120
2.7. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y TRANSCRIPTÓMICO DE LAS RESPUESTAS DEL HOSPEDADOR FRENTE A LA INFECCIÓN POR <i>F. hepatica</i>	123
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	129
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	129
3.2. TOMA DE MUESTRAS.....	131

3.2.1. TOMA DE SANGRE, OBTENCIÓN DE SUERO Y ANÁLISIS DE ENZIMAS HEPÁTICAS.....	131
3.2.2. RECOGIDA Y PROCESADO DE LÍQUIDO PERITONEAL.	132
3.2.2.1. DETERMINACIÓN Y RECUENTO DEL NÚMERO TOTAL DE LEUCOCITOS EN EL LÍQUIDO PERITONEAL.	133
3.2.2.2. PROCESADO DEL LÍQUIDO PERITONEAL: SOBRENADANTE Y PELLET.	134
3.2.2.2.1. CONCENTRACIÓN DEL LÍQUIDO PERITONEAL, PRECIPITACIÓN CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO Y ANÁLISIS MEDIANTE ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL EN GEL.....	136
3.2.2.2.2. REALIZACIÓN DE FROTIS CON EL PELLET DEL LÍQUIDO PERITONEAL.	137
3.2.3. OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS DE HÍGADO FIJADAS EN FORMOL E INCLUSIÓN EN BLOQUES DE PARAFINA.	139
3.3. ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO EN LÍQUIDO PERITONEAL E INMUNOHISTOQUÍMICO EN HÍGADO.	140
3.3.1. TÉCNICA INMUNOCITOQUÍMICA EN FROTIS DE LÍQUIDO PERITONEAL EN CONGELACIÓN PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-CD68, ANTI-CD14, ANTI-CD206, ANTI-INOS, ANTI-CD83 Y ANTI-MHC-II.....	140
3.3.2. DETERMINACIÓN Y RECUENTO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS PERITONEALES MEDIANTE TÉCNICAS DE PANÓPTICO (EXPERIMENTO 1) Y DE INMUNOCITOQUÍMICA CON CD68 Y TINCIÓN CON EOSINA (EXPERIMENTO 2).	143
3.3.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO EN MUESTRAS DE HÍGADO INCLUIDAS EN PARAFINA Y DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PERIOSTINA Y ANTI-VCAM-1.	146

3.4. NIVELES DE ANTICUERPOS EN EL LÍQUIDO PERITONEAL.....	149
3.4.1. DETECCIÓN DE NIVELES DE ANTICUERPOS ANTI-CATEPSINA L1 DE <i>F. hepatica</i> (FhCL1) EN EL LÍQUIDO PERITONEAL MEDIANTE ELISA.....	149
3.4.2. DETECCIÓN DE NIVELES DE FhCL1 ESPECÍFICOS DE <i>F. hepatica</i> EN EL LÍQUIDO PERITONEAL MEDIANTE INMUNOBLOTTING.....	150
3.5. DETERMINACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS EN LEUCOCITOS PERITONEALES.	151
3.5.1. EXTRACCIÓN DE ARNm MEDIANTE MIRNEASY MINI KIT Y TRATAMIENTO CON DNase.....	151
3.5.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE ARNm Y REALIZACIÓN DE PCR A TIEMPO REAL (qRT-PCR).....	152
3.6. ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL LÍQUIDO PERITONEAL OVINO MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS.....	156
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	158
3.7.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS OBTENIDOS CON LA TÉCNICA DE INMUNOCITOQUÍMICA EN FROTIS DE LÍQUIDO PERITONEAL.....	158
3.7.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS DE EXPRESIÓN GÉNICA Y DE PROTEÓMICA.	158

4. RESULTADOS.....	163
4.1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN EL LÍQUIDO PERITONEAL.....	163
4.1.1. RESPUESTA INMUNITARIA DE TIPO CELULAR.....	163
4.1.1.1. CONTAJE ABSOLUTO DE LEUCOCITOS PERITONEALES.....	163
4.1.1.2. CONTAJE DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS PERITONEALES.....	164
4.1.1.2.1. CONTAJE DIFERENCIAL EXPRESADO EN PORCENTAJE.....	164
4.1.1.2.2. CONTAJE DIFERENCIAL ABSOLUTO.....	168
4.1.1.3. ESTUDIO DEL INMUNOFENOTIPADO DE LOS MACRÓFAGOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS DEL LÍQUIDO PERITONEAL MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA.....	170
4.1.1.3.1. ESTUDIO EN MACRÓFAGOS DE LOS MARCADORES CD14, CD206 E INOS	170
4.1.1.3.1.1. RATIO INOS/CD206.....	182
4.1.1.3.2. ESTUDIO EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS (CDs) CON EL MARCADOR CD83.....	183
4.1.1.3.3. EXPRESIÓN DE MHC CLASE II EN MACRÓFAGOS PERITONEALES.....	186
4.1.1.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS EN LEUCOCITOS DEL LÍQUIDO PERITONEAL MEDIANTE PCR TIEMPO REAL (qRT -PCR).....	189
4.1.2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA DE TIPO HUMORAL.....	192
4.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL LÍQUIDO PERITONEAL.....	194

4.3. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DEL HÍGADO.	202
4.3.1. ESTUDIO MACROSCÓPICO DEL HÍGADO.	202
4.3.2. ESTUDIO MICROSCÓPICO DEL HÍGADO.	204
4.4. ANÁLISIS DE ENZIMAS HEPÁTICAS EN SUERO Y EN LÍQUIDO PERITONEAL. .	207
4.5. ESTUDIO DE INMUNOLocalIZACIÓN DE LA PERIOSTINA Y DE LA VCAM-1 EN EL HÍGADO.	209
DISCUSIÓN	219
5.1. CONTAJES ABSOLUTO Y DIFERENCIAL DE LOS LEUCOCITOS PERITONEALES.	221
5.2. INMUNOFENOTIPO DE LOS MACRÓFAGOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS PERITONEALES.	224
5.3. RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL Y EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN LÍQUIDO PERITONEAL.	235
5.4. ESTUDIO PROTEÓMICO EN LÍQUIDO PERITONEAL.	242
CONCLUSIONES.	253
CONCLUSIONS.	259
BIBLIOGRAFÍA.	265
ANEXO I.	315
ANEXO II.	323

AGRADECIMIENTOS

Por extraño que pueda parecer, me ha resultado más difícil escribir este apartado de agradecimientos que otras partes de la Tesis. Sois muchos los que, de una forma u otra, me habéis apoyado durante este proceso y sintetizar e intentar transmitir en unas líneas mi gratitud es bastante complicado.

En primer lugar me gustaría decir que, aunque en ocasiones tediosa, la experiencia en general ha sido muy buena y quiero destacar que lo más importante ha sido darme cuenta de que la Tesis no sólo se trata de realizar experimentos, obtener resultados y de escribir, sino que conlleva un proceso de aprendizaje bastante amplio, en el que se incluye aprender a tomar la iniciativa, comprender que cualquier cambio empieza por la voluntad de uno mismo y que si se trabaja en los propios errores desde un enfoque humilde y autocrítico no sólo se consigue ser mejor profesional, sino también mejor persona.

Me gustaría comenzar dándole las gracias a mi director de Tesis, José Pérez Arévalo, ya que él me dio la oportunidad de incorporarme al Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba y porque siempre ha encontrado un momento para dedicar a cada cuestión que le he planteado. Gracias también a mi codirectora Verónica Molina, ya no sólo porque me has ayudado mucho a lo largo de este camino, tanto en la realización de los experimentos como en la escritura de esta Tesis, sino también porque en las ocasiones que he realizado estancias en Belfast te has prestado tanto en lo profesional como en lo personal, dispuesta siempre a echar una mano, y esto es algo que valoro mucho y te tengo que agradecer. Gracias también a mi codirector Rafael Zafra, porque gracias a tu ayuda hemos podido enviar y publicar algunos

artículos de interés y también porque he aprendido mucho de ti en este periodo de aprendizaje.

Gracias al profesor John Dalton y a Krystyna Cwiklinski por haberme dado la oportunidad de colaborar con su laboratorio en Queen's University (Belfast) y por haberme ayudado tanto a la hora de encontrar un alojamiento como de procurar que me encontrara a gusto durante mi estancia en un país extranjero, incluyéndome en su grupo de salir los viernes después del trabajo para cenar y desconectar.

Gracias también a todos mis compañeros del Departamento: Abelardo, Alberto, Alfonso, Amador, Aniceto, Antonio, Fernando, Inma, Jaime, Joao, José Carlos, Librado, M^a Ángeles, M^a José, Mari, Miguel Ángel, Raquel, Silvia y Yolanda. Todos me habéis aportado algo en este tiempo y habéis influido en mi formación. Me gustaría especialmente nombrar a Irene; gracias por estar siempre dispuesta a echar una mano y por intentar siempre hacer las cosas bien; Isa, gracias porque siempre te prestas a ayudar y porque, aunque aquella vez no logramos salir del Escape Room, hemos pasado unos ratos muy agradables; a Gema, por confiar en mí y por ser una técnico de laboratorio tan competente y a Elena Mozos, por tu dedicación en la Anatomía Patológica y por contar conmigo. Gracias también a los que han pasado por el Departamento: a Paola, por ser tan práctica y por haberme ayudado en varias ocasiones, a Alejandro, porque gracias a él conocí a José Pérez, a Leticia, por las inmunos que has hecho y por esos ratos de charla y desconexión que hemos tenido.

También quiero dar las gracias a las personas de la Cátedra de Parasitología: Álvaro Moreno y Javier Moreno, por haberme apoyado en la realización de las estancias en Belfast, ha sido una experiencia muy

enriquecedora. Gracias también a Leandro, Maribel, Raúl, Santiago y Sete por la colaboración en los proyectos de investigación que llevamos de manera conjunta.

Gracias a mis padres por haberme dado la educación que tengo, haber querido siempre lo mejor para mí y apoyarme en todas las decisiones de mi vida, incluida esta. Gracias a mi hermano por simplemente estar y porque has demostrado que cualquiera puede conseguir lograr su sueño si le pone dedicación y pasión.

Gracias a José Manuel, por haberte implicado en la búsqueda de mi bienestar y felicidad en los peores momentos, por tu paciencia y ayuda en todo lo referente a esta Tesis y gracias, sobre todo, por demostrar con hechos y no con palabras.

Gracias a Isabel Rial, María Llorián y Ada Fernández. Vosotras me animasteis siempre desde una sana amistad a seguir con este proyecto y lograsteis motivarme de todas las maneras posibles. Gracias también a Edu, por todos esos buenos ratos tanto fuera como dentro del trabajo. Gracias de corazón, os echo mucho de menos.

Gracias a Irene Aracil, porque transmites alegría y porque escuchar tu criterio siempre me ayuda; a Gloria, por haberte preocupado por mí en esta recta final y por nuestras cenas en la Conchinchina con Cris, a Fer y a Graci, por nuestros ratos de desconexión en conciertos y tomando cerveza en cualquier terraza. Gracias a María Reina, por quitar importancia a las cosas que no la tienen y gracias a Chinchilla, amiga y compañera de profesión que está tanto en buenos como en malos momentos.

Gracias también a todas las personas que no he nombrado pero que tengo presentes y que me han ayudado a ser la persona que soy hoy y que ha conseguido cumplir este propósito. Muchísimas gracias a todos.

“Sobre todo, no temas a los momentos difíciles. Lo mejor viene de ellos”.

Rita Levi-Montalcini. Neuróloga y política italiana. Premio Nobel de Medicina en 1986.

“Donde hay soberbia, allí habrá ignorancia; más donde hay humildad, habrá sabiduría”.

Ramón Ruiz Frías. Mi abuelo y médico de Puente de Génave (Jaén) hasta el año 1988.

ABREVIATURAS

- ABC: *Avidin-Biotin Complex*/ Complejo avidina-biotina.
- ADCC: *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*/ Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ADNc: ADN complementario.
- APCs: *Antigen presenting cells*/ Células presentadoras de antígenos.
- Apo A-IV: Apolipoproteína A-IV.
- ALT: Alanina aminotransferasa.
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.
- AST: Aspartato aminotransferasa.
- BCR: *B cell receptor*/ Receptor de células o linfocitos B.
- B2M: Beta-2-microglobulina.
- CD: *Cluster of differentiation*/ Cúmulo de diferenciación.
- CD: Células dendríticas.
- CPAs: células presentadoras de antígenos.
- Ct: *Threshold point*/ Ciclo umbral.
- DE: Desviación estándar.
- DPBS: *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*/ Tampón fosfato salino de Dulbecco.
- dpi: Días post-infección.
- DTT: *Dithiothreitol*/ Ditiotreitól.
- EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*/ Ácido etilendiaminotetraacético
- emPAI: *Exponentially modified protein abundance index*/ Índice modificado de abundancia de proteínas.
- ES/MS-MS: *Electrospray ionization and Tandem Mass Spectrometry*/ Ionización por electrospray y espectrofotometría de masas en tándem
- ESTs: *Expressed sequence tags*/ Marcadores de secuencia expresada.
- FABP: *Fatty-acid-binding proteins*/ Proteínas transportadoras de ácidos grasos.
- FDR: *False discovery rate*/ Tasa de descubrimientos falsos.
- *F. hepatica*: *Fasciola hepatica*.
- FhESP: Productos de excreción-secreción de *F. hepatica*.
- FhHDM-1: *F. hepatica helminth defense molecule-1*/ Molécula helmíntica de defensa de *F. hepatica*-1.
- Fhmuc: Péptido tipo mucina de *F. hepatica*.
- FhTeg: Tegumento de *F. hepatica*.
- FhTLM: Factor de crecimiento de *F. hepatica* similar a TGF.

- GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*/ Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
- GGT: Gamma-glutamyl-transferasa.
- GLDH: Glutamato deshidrogenasa.
- GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*/ Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.
- HDMs: *Helminth Defence Molecules*/ Moléculas defensivas de helmintos.
- H-E: Hematoxilina-eosina.
- HLA: *Human leukocyte antigen*/ Antígeno leucocitario humano.
- IFN γ : Interferón gamma.
- Ig: Inmunoglobulina.
- IL: Interleuquina.
- iNOS: Enzima óxido nítrico sintetasa inducible.
- qPCR: *Real-time polymerase chain reaction*/ Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
- LPS: Lipopolisacárido.
- M1: Fenotipo expresado por macrófagos activados mediante la vía clásica.
- M2: Fenotipo expresado por macrófagos activados mediante la vía alternativa.
- M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor*/ Factor estimulador de colonias de macrófagos.
- MHC: *Major histocompatibility complex*/ Complejo mayor de histocompatibilidad.
- NBT/BCIP: *Nitroblue tetrazolium chloride/ 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine, salt*/ Azul nitro-tetrazolio cloruro/ 5-bromo-4-cloro-3'- indolil fosfato p-toluidina, sal
- NEJs: *Newly excysted juveniles*/ Formas juveniles de *F. hepatica* recién desenquistadas.
- NI: No infectados.
- NK: Células *Natural Killer*.
- NLH: Nódulos linfáticos hepáticos.
- NO: *Nitric oxide*/ Óxido nítrico.
- OD: *Optical density*/ Densidad óptica.
- PAMPs: *Pathogen-associated molecular patterns*/ Patrones moleculares asociados a patógenos.
- PBMCs: *Peripheral blood mononuclear cell*/ Célula mononuclear de sangre periférica.
- PBST: Phosphate buffered saline with Tween 20/ Tampón fosfato salino con Tween 20.

- PRRs: *Pattern recognition receptors*/Receptores de reconocimiento de patrones.
- Prx: *Peroxiredoxin*/ Peroxirredoxina.
- RNAseq: *RNA sequencing*/ secuenciación de ARN.
- SAGE: *Serial analysis of gene expression*/ Análisis en serie de la expresión génica.
- RT-qPCR: *Reverse transcription Real-time polymerase chain reaction*/ Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real con transcriptasa inversa.
- SDH: Sorbitol deshidrogenasa.
- SDS: *Sodium dodecyl sulfate*/ Dodecilsulfato sódico.
- SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis/ Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
- spi: Semanas post-infección.
- TA: Temperatura ambiente.
- TBS: *Tris Buffered Saline*/ Tris salino tamponado.
- TBST: *Tris Buffered Saline with Tween 20*/ Tris salino tamponado con Tween 20.
- TCA: *Trichloroacetic acid*/ Ácido tricloroacético.
- TCR: *T Cell receptor*/ Receptor de células o linfocitos T.
- TGF: *Transforming Growth Factor*/ Factor de crecimiento transformante.
- TGFβ: *Transforming Growth Factor beta*/ Factor de crecimiento transformante beta.
- Th: *T helper lymphocytes*/ Linfocitos T helper o activados.
- TLR: *Toll-like receptors*/ Receptores tipo Toll.
- TNF-α: *Tumor necrosis factor alpha*/ Factor de necrosis tumoral alpha.
- Tregs: Linfocitos T reguladores.
- VCAM-1: *Vascular cell adhesion molecule-1*/ Molécula de adhesión celular vascular-1.
- 2D/2DE: Electroforesis en gel en dos dimensiones.
- 1D/1DE: Electroforesis en gel de una dimensión.

RESUMEN

La fasciolosis causada por *Fasciola hepatica* es una enfermedad parasitaria de gran repercusión sanitaria y económica en rumiantes, principalmente en zonas de clima templado. Este parásito ha desarrollado mecanismos capaces de modular o suprimir la respuesta inmunitaria del hospedador, haciéndola inefectiva y permitiendo la instauración crónica del parásito. La investigación de los mecanismos de inmunomodulación de *F. hepatica* resulta crucial para poder diseñar una vacuna eficaz que pueda solventar el problema de la instauración de resistencias frente a los antihelmínticos tradicionalmente utilizados en el control de esta enfermedad.

Se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar los mecanismos de respuesta inmunitaria y acción del parásito en las fases crónicas de la enfermedad. Sin embargo, los estudios en las fases tempranas, cuando el parásito atraviesa el intestino y migra hacia el hígado a través del compartimento peritoneal son escasos y casi todos en el modelo murino. El principal objetivo de la presente Tesis Doctoral es estudiar la respuesta inmunitaria en el compartimento peritoneal y en el hígado en las fases tempranas de infecciones experimentales con *F. hepatica* en la oveja.

Para la consecución de este objetivo, se llevaron a cabo dos experimentos (**experimento 1** y **experimento 2**). En cada experimento se utilizaron 25 ovejas de 8 meses de edad de raza Merina las cuales fueron divididas en 5 grupos (n=5), cuatro de los cinco grupos se infectaron oralmente con una dosis de 150 metacercarias de *F. hepatica*. Estos grupos fueron eutanasiados a los 1, 3, 9 y 18 días post-infección (dpi). El quinto grupo se utilizó como grupo control no infectado y se sacrificó al final del

experimento. Durante la necropsia, se realizaron lavados peritoneales de los animales inmediatamente después de los sacrificios para la recogida del líquido peritoneal y, posteriormente, se tomaron muestras de hígado.

En los **experimentos 1 y 2**, el líquido peritoneal se utilizó para realizar el conteo absoluto y diferencial de los leucocitos peritoneales. Los resultados revelaron un reclutamiento activo de leucocitos hacia la cavidad peritoneal de la oveja en los animales infectados a partir de los 9 dpi, principalmente representado por eosinófilos. Los frotis de células peritoneales se sometieron a la técnica de inmunocitoquímica para determinar la expresión de los marcadores celulares: CD68, CD14, CD206, iNOS, CD83 y MHC-II, los cuales están presentes en macrófagos y en células dendríticas. El aumento significativo en la expresión de CD206 y escasa variación en la expresión de iNOS en los macrófagos peritoneales en ambos experimentos sugieren que existe una polarización hacia un fenotipo de activación alternativa o M2 desde el día uno tras la infección. El aumento significativo en la expresión del marcador CD14 desde el 3 dpi en comparación con el grupo no infectado en ambos experimentos, podría estar relacionado con fenómenos tanto de activación fagocítica en los macrófagos como de fibrosis. En el **experimento 1**, se observó un aumento en la expresión del marcador de células dendríticas maduras CD83 y del marcador de células presentadoras de antígeno MHC-II desde el 1 dpi. Sin embargo, este hecho no ocurrió de una manera tan obvia en el **experimento 2**, debido a la elevada variabilidad entre animales.

El estudio de la expresión de citoquinas del líquido peritoneal mediante qRT-PCR de ovejas infectadas (18 dpi) y no infectadas del **experimento 1**, determinó la presencia elevada de las citoquinas IL-10, IL-12, IL-13, IL-23 y TGF- β en ovejas a los 18 dpi, aunque sin diferencias

significativas en comparación con los resultados del grupo control no infectado, indicando que la respuesta inmunitaria en este compartimento no ha sido todavía estimulada hacia una de tipo Th2, asociada con la enfermedad crónica.

Con el fin de evaluar la presencia de posibles biomarcadores en la infección temprana con *F. hepatica*, se realizó un estudio de proteómica con muestras del líquido peritoneal y de inmunohistoquímica con muestras de hígado de los animales infectados y sacrificados a los 18 dpi y de los animales control no infectados del **experimento 1**. En el estudio proteómico del líquido peritoneal se identificaron proteínas relacionadas con la infección, incluyéndose diversas proteínas estructurales derivadas de la matriz extracelular hepática, relacionadas con el tejido conectivo y el epitelio, y proteínas relacionadas con el sistema inmunitario. Cabe destacar el marcado aumento de la proteína periostina en el líquido peritoneal y en el citoplasma de los hepatocitos localizados alrededor de los focos necróticos de animales infectados a los 18 dpi. Se ha relacionado que la periostina podría ser un biomarcador de respuestas inflamatorias de tipo Th2 en las que están involucradas los eosinófilos. El origen de la presencia de esta proteína en el líquido peritoneal podría ser el propio tejido hepático dañado por el parásito o los eosinófilos peritoneales, estando esta proteína involucrada en procesos de fibrosis.

La molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) también fue identificada mediante proteómica, estando presente de manera abundante en el líquido peritoneal de ovejas infectadas (18 dpi) y, además, se observó una marcada expresión en el tejido hepático. Esta proteína se asocia con procesos crónicos y podría estar involucrada, junto con la periostina, en la mediación del reclutamiento leucocitario que tiene lugar en la cavidad

peritoneal, estando también relacionadas con desórdenes inflamatorios caracterizados por una eosinofilia marcada.

SUMMARY

Fascioliasis is a parasitic disease caused by *Fasciola hepatica* with important sanitary and economic repercussion on ruminants in temperate zones. This parasite has developed mechanisms that are able to suppress the host immune response, thus allowing the establishment of the parasite and resulting in chronic disease. Research based on the understanding of *F. hepatica* immunomodulatory mechanisms is crucial for the designing of an effective vaccine to solve the issue of the emerging resistance to the traditionally use of antihelmintic drugs.

Numerous studies have been carried out to determine the modulatory effects of the parasite in the chronic phase of the disease. However, studies in the early stages of the infection are scarce and mostly focused on murine models. The principal aim of this Thesis is to study the immune response to *F. hepatica* infection in the early stages of infection within the peritoneal compartment and liver in sheep.

Two experiments were carried out, namely **experiment 1** and **experiment 2**. In each experiment, twenty-five 8-month-old Merino-breed sheep were used for each experiment and were allocated into five groups (n = 5). Four of the five groups were orally infected with a dose of 150 metacercariae of *F. hepatica* and euthanized at 1, 3, 9 and 18 days post-infection (dpi). The fifth additional group was used as uninfected control. During the necropsy, peritoneal lavages were performed and liver samples were taken.

In **experiments 1** and **2**, absolute and differential number of peritoneal leucocytes were obtained. The absolute number of leucocytes increased from 9 dpi onwards in both experiments compared to the uninfected control group, being these leucocytes mainly composed by

eosinophils. These results suggest that there is an active recruitment of leucocytes into the peritoneal cavity at these early stages of infection. The peritoneal cells were fixed in smears and subjected to the immunocytochemistry technique to assess the following cellular markers: CD68, CD14, CD206, iNOS, CD83 and MHC-II. Macrophages and dendritic cells were considered for the immunocytochemical assessment. Peritoneal macrophages showed a marked increase in CD206 expression since one dpi onwards in both experiments respect to the uninfected control group, while mild change in iNOS expression was found along the infection in both experiments. These results suggest that a polarization towards an alternative phenotype (M2) was taking place in peritoneal macrophages from the first dpi onwards. The expression of CD14 increased since 3 dpi onwards in macrophages from both experiments comparing with the uninfected control group, which may be due to an increase in the macrophage activity related to tissue repair and phagocytosis. In **experiment 1**, there was an increase in the expression of the mature dendritic cell marker CD83 and the antigen-presenting cell marker MHC-II since one dpi onwards compared to the uninfected control group. Nevertheless, this fact was not found in **experiment 2**, perhaps due to the high individual variability found between sheep of the same group.

In **experiment 1**, a study of the peritoneal fluid of infected (18 dpi) and uninfected sheep was carried out using the qRT-PCR technique. Cytokines IL-10, IL-12, IL-13, IL-23 and TGF- β gene expression showed a tendency to be enhanced with respect to the uninfected control group. Nevertheless, no statistical differences were found, suggesting that the immune response has not yet been skewed towards a Th2 type, associated with chronic disease.

With the aim of evaluating the presence of possible biomarkers in the early infection with *F. hepatica*, a proteomic study using peritoneal fluid together with an immunohistochemical study with liver samples from infected (18 dpi) and non-infected animals from **experiment 1** was conducted. Proteomic analysis of the peritoneal fluid identified infection-related proteins, including several structural proteins derived from the liver extracellular matrix, connective tissue and epithelium, and immune system-related proteins. A marked increase in the amount of periostin protein in the peritoneal fluid and in the cytoplasm of the hepatocytes located around the necrotic foci of infected animals at 18 dpi was observed. It has been pointed out that periostin could be a biomarker for Th2 type immune responses in which eosinophils are involved.

The vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) was also identified by proteomics, with marked increase at 18 dpi respect to the uninfected control group and strong expression within the liver tissue. This protein has been associated with chronic processes and could be involved, along with periostin, in the mediation of leucocyte recruitment that takes place in the peritoneal cavity of infected animals, being also present in inflammatory disorders characterized by marked eosinophilia.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria causada por el parásito helminto *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) y está considerada como una enfermedad de gran repercusión sanitaria y económica tanto en la ganadería ovina como en la bovina de todas las regiones templadas del planeta (Rojo-Vázquez y cols., 2012; Charlier y cols., 2014), estando estas pérdidas económicas estimadas en más de 3 mil millones de dólares por año (Mas-Coma y cols., 2005; Keiser y Utzinger., 2009; Piedrafita y cols., 2010; Beesley y cols., 2017).

F. hepatica también afecta a seres humanos, siendo la mayoría de los casos descritos en regiones del mundo donde las prácticas de manejo agrícola permiten que los animales infectados pasten entre la vegetación consumida por humanos, como son el Altiplano Andino (Bolivia, Perú y Ecuador), Egipto e Irán (Mas-Coma y cols., 2009; Fürst y cols., 2012; Hotez y cols., 2012). Dado que la fasciolosis es una enfermedad zoonótica, el ser humano también puede verse afectado por esta parasitosis mediante la ingesta de agua o vegetales contaminados con la forma infectante del parásito (metacercaria). Las infecciones en humanos a nivel global están estimadas entre 2 y 17 millones de personas afectadas, con 180 millones de personas en riesgo (Mas-Coma y cols., 2005; Nguyen y cols., 2011). La distribución geográfica cada vez mayor de *F. hepatica* también tiene un impacto en las infecciones humanas con fasciolosis que se han notificado recientemente en áreas de Pakistán (Afshan y cols., 2014).

Durante los últimos años ha tenido lugar un aumento progresivo de la prevalencia de fasciolosis en Europa, probablemente debido al desarrollo de resistencia frente a los antihelmínticos de elección más eficaces, aunque también se ha sugerido que el cambio climático, con inviernos cada vez más suaves, puede haber contribuido a dicha elevación (Fairweather, 2011; Fox

y cols., 2011). Existen datos recientes que sugieren que el patrón de infecciones por helmintos podría estar cambiando en Escocia ya que el clima en Reino Unido es variable. Van Dijk y colaboradores (2010) escribieron que, en los últimos 5-10 años, se observaron aumentos muy significativos en la tasa global de diagnóstico de nematodos gastrointestinales en Gran Bretaña y sugirió que el efecto del cambio climático sobre la epidemiología del parásito resultó ser la explicación más probable de todos los patrones observados.

En el noroeste de España también se han llevado a cabo estudios que sugieren que la prevalencia en la infección por *F. hepatica* en ovejas entre los años 2006-2011 es más alta (59,9%) que los llevados a cabo en la misma área a principios de la década de 1990, siendo la posible causa de este cambio las diferencias en las condiciones climáticas (Martínez-Valladares y cols., 2013). En Galicia, se ha descrito una prevalencia en ovejas del 83%, con un porcentaje de fasciolosis activa del 59,9% (Paz-Silva y cols., 2003) y en bovinos del 67% (Arias y cols., 2013). Estos resultados corroboran el hecho de que la prevalencia en España es mayor en estas zonas del noroeste debido principalmente a factores que influyen directamente en el ciclo biológico del parásito, como es la humedad. En Andalucía, debido a su clima más seco, la prevalencia de *F. hepatica* en ovejas es bastante menor, siendo en la provincia de Granada la prevalencia esta parasitosis en oveja del 5,17% (Illescas Gómez y cols., 1994) y de un 3% en caprinos en las zonas de Córdoba y Granada (Martínez Moreno y cols., 1996).

La severidad del proceso patológico en animales de producción está en función de la dosis infectante y de la pauta de reinfección, pudiendo diferenciarse entre procesos agudos de alta mortalidad o, lo que es más frecuente, procesos crónicos con marcada repercusión en la producción

cárnica, láctea y lanar, así como un descenso apreciable en la capacidad reproductiva (Schweizer y cols., 2005).

El triclabendazol ha sido el antihelmíntico de elección más eficaz para tratar la fasciolosis del ganado durante más de 20 años y, también, se ha utilizado con éxito para tratar casos humanos de fasciolosis. Es el antihelmíntico más eficaz contra formas inmaduras y maduras del parásito (Boray y cols., 1983), mientras que otros antihelmínticos sólo son efectivos en las fases maduras de 8 a 14 semanas postinfección (Kelley y cols., 2016). Sin embargo, la resistencia al triclabendazol y la gran dependencia de este único fármaco ponen en peligro las estrategias de tratamiento para fasciolosis (Brennan y cols., 2007). El corto periodo de acción de este fármaco, junto con la posibilidad de que el animal se reinfecte si continúa pastando en prados contaminados, obliga a su uso reiterado en zonas endémicas, con el consiguiente coste económico y riesgo de adquirir dicha resistencia. En España, se ha descrito resistencia frente a este fármaco y, además, frente a otros antihelmínticos como el albendazol y el clorsulón (Álvarez-Sánchez y cols., 2006; Sanabria y cols., 2013).

El descubrimiento de nuevos medios de control e intervención para la fasciolosis requiere conocer e interpretar el ciclo de vida del parásito como una interacción compleja entre el parásito y el huésped. Las larvas de parásitos denominadas cercarias son liberadas por los caracoles que se enquistan en el pasto y otras vegetaciones como metacercarias, que pueden sobrevivir hasta por un año (Andrews, 1999). Después de la ingestión por parte de los animales en el pastoreo, los parásitos emergen de sus quistes en el intestino (NEJs: *Newly excysted juveniles*/ Formas juveniles de *F. hepatica* recién desenquistadas), atraviesan la pared intestinal, que se demora unas horas, antes de migrar al hígado a través del peritoneo. Sus

actividades de alimentación y migratorias inducen la producción y secreción de moléculas que poseen una potente actividad inmunosupresora, comprometiendo la resistencia natural del hospedador. Por estas razones, la obtención de vacunas eficaces frente a helmintos, concretamente frente a *F. hepatica*, supone un reto para la comunidad científica y, a pesar de los esfuerzos realizados durante las últimas décadas, ningún posible candidato vacunal contra este parásito ha alcanzado una etapa comercial o pre-comercial debido principalmente a su alta capacidad inmunomoduladora (Flynn y cols., 2010; Morpew y cols., 2013; Toet y cols., 2014; Molina-Hernández y cols., 2015).

Se ha demostrado que los macrófagos tienen una función muy importante en la interacción parásito-hospedador en fases tempranas de la infección por *F. hepatica*. Los macrófagos son unas células del sistema inmunitario innato que detecta la invasión microbiana a través del reconocimiento de receptores de patrones moleculares microbianos específicos (PAMPs: *Pathogen-associated molecular patterns*/ Patrones moleculares asociados a patógenos). Cuando los macrófagos entran en contacto con el agente infeccioso, se produce la liberación de citoquinas IL-6, IL-12 y TNF- α (Medzhitov, 2007). Estas acciones suponen un paso fundamental en el desarrollo de respuestas inmunitarias adaptativas protectoras, aunque una inflamación excesiva de esta respuesta inflamatoria podría conducir a sepsis, shock séptico y muerte (Castellheim y cols., 2009; Giuliani y cols., 2010).

Se ha descrito que los macrófagos peritoneales procedentes de rata y oveja difieren sustancialmente en su capacidad para generar óxido nítrico. Sólo las células residentes en el lavado peritoneal de rata pudieron mediar una citotoxicidad dependiente de anticuerpos contra las larvas de *Fasciola*

recién desenquistadas (NEJs). Las diferencias entre estos dos hospedadores en matar NEJs podría tener que ver con las diferencias en la magnitud de la respuesta a los radicales libres por los macrófagos peritoneales (Piedrafita y cols., 2001).

Los macrófagos pueden activarse mediante dos fenotipos antagónicos, la activación clásica o M1, caracterizada por una elevada producción de radicales de oxígeno y citoquinas proinflamatorias y la activación alternativa o M2, caracterizada por baja producción de radicales de oxígeno, elevada producción de arginasa y citoquinas anti-inflamatorias como IL10 (Martínez y cols., 2009; Wang y cols., 2014). Los macrófagos M2 tienen un papel fundamental en la reparación del tejido del huésped, la fibrosis tisular y la modulación de la inmunidad adaptativa durante la infección por helmintos. La infección por *F. hepatica* induce mediante productos excretores-secretores (FhESP) en modelos de laboratorio una activación M2 de macrófagos/monocitos sanguíneos (Donnelly y cols., 2008; Hamilton y cols., 2009; Vukman y cols., 2013).

En algunos estudios también se ha demostrado que los macrófagos peritoneales de ratones infectados con *F. hepatica* sufren un cambio hacia un perfil no inflamatorio o alternativo. Así, se ha descrito que los FhESP de este parásito tienen un efecto inmunomodulador en el hospedador. Entre los FhESP se han identificado diferentes tipos de HDMs (*Helminth Defence Molecules*/ Moléculas defensivas de helmintos), los cuales protegen de respuestas de tipo inflamatorio en ratones y previenen la activación clásica o inflamatoria en macrófagos, limitando la inflamación y facilitando la penetración del parásito a través de la pared intestinal durante la migración (Robinson y cols., 2011; 2013). La peroxirredoxina (Prx) presente en FhESP también induce el reclutamiento de macrófagos y activación a M2

de macrófagos murinos *in vivo* e *in vitro* (Donnelly y cols., 2005; 2008). El tegumento de *F. hepatica* (FhTeg) también se ha demostrado que es otra fuente importante de moléculas inmunomoduladoras y que induce el fenotipo M2 en macrófagos peritoneales de ratones *in vivo* (Adams y cols., 2014).

La proteína Fh12, componente de las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP) de *F. hepatica*, también ha mostrado un potente papel antiinflamatorio, ya que indujo la expresión y actividad de la arginasa y reguló de manera negativa la producción de óxido nítrico, sugiriendo que esta proteína induce la producción de macrófagos activados alternativamente en humanos (Figueroa-Santiago y Espino, 2014). Recientemente, un estudio transcriptómico en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs/ *peripheral blood mononuclear cells*) de ovinos infectados con *F. hepatica* demostró una marcada activación M2 caracterizada por marcado incremento en la expresión de genes de la arginasa y descenso en la expresión de genes de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Fu y cols., 2016).

Los estudios de proteómica relacionados con *F. hepatica* están teniendo una expansión reciente y se han centrado principalmente en el análisis de subclases de proteínas, como son las catepsinas (Dalton y cols., 2003) y las glutatión S-transferasas (Hillyer, 2005; Chemale y cols., 2006). Además, también se están desarrollando estudios más avanzados para la identificación de proteínas como las contenidas en los FhESP *in vitro* (Jefferies y cols., 2001) y una comparación entre los FhESP detectados *in vitro* y en conducto biliar de ovejas infectadas (Morphew y cols., 2007) mediante electroforesis en gel en dos dimensiones (2D). Sin embargo, han sido muy escasos los estudios de proteómica en el hospedador infectado con

F. hepatica y se han limitado a cambios en marcadores séricos (Rioux y cols., 2008).

En la rata, se ha demostrado que la respuesta inmunitaria protectora ocurre durante los estadios tempranos tras la infección a nivel intestinal o peritoneal (Van Milligen y cols., 1998). Por tanto, el estudio de los mecanismos de respuesta inmunitaria durante la migración peritoneal resulta interesante para tratar de dilucidar posibles mecanismos efectores o mecanismos de inmunomodulación empleados por el parásito para evadir la respuesta del hospedador durante esta etapa de la infección. Sin embargo, hasta la fecha los ensayos vacunales en rumiantes se han centrado en estudios de estadios tardíos de la infección para evaluar la carga parasitaria y eliminación de huevos, lo que no ha permitido el estudio de los mecanismos de respuesta y/o modulación de la respuesta inmunitaria en fases tempranas de la infección, que es cuando ésta es eficaz para la eliminación de los parásitos en estadios juveniles. Algunos estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo han analizado las poblaciones de leucocitos peritoneales en cabras y ovejas en fases tempranas de la infección por *F. hepatica* (Zafra y cols., 2013a y b; Escamilla y cols., 2017), pero no se ha llevado a cabo una caracterización de la activación de macrófagos, expresión de citoquinas, ni estudios proteómicos en líquido peritoneal.

Con estos antecedentes, el objetivo genérico de esta Tesis Doctoral es el estudio la respuesta inmunitaria en líquido peritoneal en ovejas infectadas con *F. hepatica* durante fases tempranas de la infección. Para alcanzar este objetivo hemos realizado dos experimentos con ovejas infectadas en fases tempranas con *F. hepatica* en los que se han analizado tanto el líquido peritoneal como el hígado, con el fin de conseguir los siguientes objetivos específicos:

1.- Recuento absoluto del número total de leucocitos peritoneales a los 1, 3, 9 y 18 días post-infección (dpi) tras la infección experimental de ovejas con *F. hepatica* y comparación con ovejas control no infectadas.

2.- Recuento diferencial de los tipos de células inflamatorias presentes en el líquido peritoneal (linfocitos, macrófagos y eosinófilos) de ovejas infectadas a los 1, 3, 9 y 18 dpi y comparación con ovejas control no infectadas.

3.- Caracterización inmunocitoquímica del inmunofenotipo de los macrófagos y células dendríticas peritoneales, así como el tipo de activación de macrófagos (M1-M2) a los 1, 3, 9 y 18 dpi tras la infección experimental de ovejas con *F. hepatica* y comparación con ovejas control no infectadas.

4.- Estudio de la expresión génica de citoquinas proinflamatorias y reguladoras a los 18 dpi en ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica* y comparación con ovejas control no infectadas.

5.- Estudio de los niveles de IgG anti-FhCL1 en líquido peritoneal de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica* a los 18 dpi y comparación con ovejas control no infectadas.

6.- Estudio proteómico de líquido peritoneal de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica* a los 18 dpi y comparación con ovejas control no infectadas.

7.- Evaluación de los cambios macroscópicos y microscópicos del hígado de ovejas experimentalmente con *F. hepatica* a los 18 dpi y comparación con ovejas control no infectadas.

8.- Estudio de los niveles séricos de enzimas indicativas de daño hepático en ovejas experimentalmente con *F. hepatica* a los 18 dpi y comparación con ovejas control no infectadas.

9.- Inmunolocalización de las proteínas periostina y la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1/*Vascular cell adhesion molecule-1*) en hígado de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica* a los 18 dpi y comparación con ovejas control no infectadas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ETIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN.

Fasciola hepatica (*F. hepatica*) es un parásito helminto hermafrodita que se clasifica dentro del phylum Platyhelminthes, clase Trematoda, subclase Digenea, orden Echinostomida y familia Fasciolidae. Tiene una morfología foliácea y aplanada dorsoventralmente en su estadio adulto y mide de 2 a 3 cm de largo por 1 a 1,5 cm de ancho. Este helminto presenta una coloración pardo-grisácea y su extremo anterior presenta una estructura cónica donde se halla la boca y a partir de la cual el cuerpo se ensancha para formar los denominados “hombros” (Figura 1). Cerca de la boca se encuentran las ventosas oral y ventral, próximas entre sí, siendo la ventosa ventral de mayor tamaño. Su cuerpo está dotado de un tegumento con espinas dirigidas caudalmente, cuyas funciones son mantener la posición en el interior de los conductos biliares, así como erosionar el parénquima hepático y los vasos sanguíneos (Bennet, 1975). Las fases larvarias se multiplican abundantemente, de manera que a partir de un solo huevo fértil se producirían miles de formas infectantes, las cuales se distribuyen por medios principalmente acuáticos, como acequias y canales de riego, quedando adheridas a las hojas de las plantas y contaminándose también las praderas, los pastizales, el agua para beber o de regadío y, finalmente, el ganado y los seres humanos (Carrada-Bravo, 2007).



Figura 1.
Ejemplar
adulto de *F.*
hepatica.
Fuente: Dra.
Irene de
Haro-
Arteaga
(UNAM).

Las formas adultas de este parásito se localizan en los conductos biliares mayores (Figura 2) y vesícula biliar de gran cantidad de especies, aunque se consideran más susceptibles los rumiantes, concretamente los ovinos (Manga y cols., 1990; Konopka, 1993; Mitchell, 1995), los caprinos (Khallaayoune y cols., 1991) y los bovinos (González-Lanza y cols., 1989; Genicot y cols., 1991; Poglayen y cols., 1995).

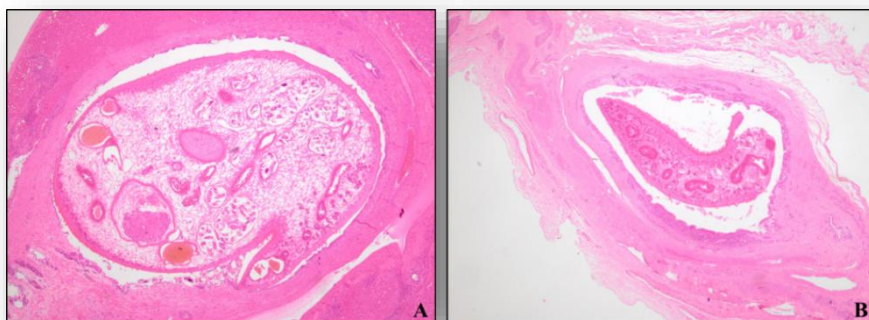


Figura 2 A y B. Imágenes de cortes histológicos en los que se observan larvas del parásito *F. hepatica* dentro de conductos biliares a 20x aumentos.

La susceptibilidad a la infección por *F. hepatica* puede variar en función del tipo de hospedador, clasificándose en tres grupos. En el primero, se incluyen aquéllos hospedadores que reaccionan rápidamente frente al parásito y evitan su desarrollo, como son el cerdo, el perro y el gato (Cordero y cols., 2010); en el segundo grupo, se incluyen los que reaccionan con retraso ante la invasión parasitaria ya implantada que serían la vaca, el caballo y el hombre (Haroun y Hillyer, 1986; Martínez-Moreno y cols., 1997; Morales y cols., 2000; Cordero y cols., 2010) y, en último lugar, se encuentran los mamíferos más susceptibles, en los que existe una alta patogenicidad por parte del parásito (oveja, cabra y conejo) (Reddington y

cols., 1986; Chauvin y cols., 1995; Martínez-Moreno y cols., 1997, 1999; Apt y cols., 1993; Cordero y cols., 2010).

En una investigación paleoparasitológica realizada en el Valle de Saale-Unistrut de Alemania, se demostró la presencia de huevos de *F. hepatica* en un esqueleto humano prehistórico y en los restos de un bovino de 3.000 años a.C.; hechos que indican que la trematodiasis era ya endémica en estas épocas (Dittmar y Teegen, 2003).

Además, la fasciolosis se ha clasificado según la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las enfermedades tropicales reemergentes y olvidadas asociada con brotes endémicos y epidémicos en humanos, principalmente en países en vías de desarrollo como América Latina, África y Asia, donde la infección humana está íntimamente ligada a una elevada prevalencia en el ganado (Nguyen y cols., 2011). Según la OMS, actualmente hay entre 2,4 y 17 millones de personas afectadas y se estima que entre 90 y 180 millones de personas viven en situación de alto riesgo de contraer la enfermedad (Mas-Coma y cols., 2009; Mas-Coma y cols., 2014). En Europa, *F. hepatica* está asociada mayoritariamente con enfermedades en ovino, bovino y caprino, aunque puede afectar también a caballos y fauna silvestre, con el efecto negativo que conlleva en la diseminación del parásito y la dificultad implícita en el control de la enfermedad. Dada la repercusión de la fasciolosis en la producción de carne, leche y lana, y el descenso de la fertilidad, actualmente se estima que las pérdidas anuales a nivel mundial en el ganado ascienden a 3000 millones de dólares (Beesley y cols., 2017).

F. hepatica tiene una distribución cosmopolita, encontrándose ampliamente distribuido en Europa, América del Sur, América del Norte,

Asia, Australia, Nueva Zelanda y algunos países de África del Norte, así como zonas frías y altas en Pakistán, Kenia y Sudáfrica (Torgerson y Claxton, 1999). En el caso de Europa, en los últimos años ha tenido lugar un aumento progresivo en la prevalencia de la fasciolosis, probablemente debido al desarrollo de resistencia frente a fármacos antihelmínticos (Fairweather, 2011; Fox y cols., 2011; Dalton y cols., 2013). Además, los cambios que se han producido actualmente en las prácticas agrícolas, el aumento del transporte de animales y los cambios climatológicos han creado ambientes que facilitan la diseminación rápida y generalizada de los parásitos que se transmiten por alimentos y agua (Gajadhar y cols., 2006). Recientemente, un grupo de investigadores analizó, mediante un modelo de predicción a largo plazo, el efecto del cambio climático respecto a la diseminación de este parásito en el Reino Unido. Demostraron que el cambio climático está íntimamente ligado con los cambios en la distribución de la fasciolosis, lo que provocará un aumento en la distribución geográfica y la severidad de los casos debido, entre otros factores, a la presencia de inviernos más cálidos, que permiten la actividad del hospedador intermediario (*Galba truncatula*) durante más tiempo (Fox y cols., 2011) y la presencia, a su vez, del estadio infectante del parásito (metacercaria) (Charlier y cols., 2014). De manera que, la prevalencia a nivel de rebaños en Europa, puede variar del 7% en Suecia al 97% en granjas alpinas y del 4% en el sur de Italia al 61,6% en granjas de ovejas en Irlanda (Charlier y cols., 2014; Rinaldi y cols., 2015; Beesley y cols., 2017).

En España, la prevalencia de la enfermedad es muy variable y atiende a factores como son la temperatura, la humedad y las precipitaciones (Martínez-Valladares y cols., 2013). La presencia de esta parasitación no sólo se ha descrito en humanos, sino también en ovejas, cabras, vacas,

gamos, cerdos, jabalíes, asnos, caballos, conejos y liebres (Rojo-Vázquez y Ferre, 1999). El hospedador intermediario (*Galba truncatula*) presenta una amplia distribución geográfica y requiere de humedad ambiental elevada para su desarrollo y supervivencia (Graczyk y Fried, 1999). Por todo esto, regiones que tengan temperaturas moderadas y elevada humedad presentarán más riesgo de desarrollar la enfermedad, ya que influyen de manera positiva en el ciclo biológico del parásito. En Galicia, concretamente, se estipuló que las cabras de más edad presentaban una mayor prevalencia (24,3%) que las jóvenes (9,4%) y la raza autóctona (Cabra Galega) presentó menor prevalencia (13,7%) que la raza cruzada (26,7%) (Pérez-Creo y cols., 2016). De manera similar, en bovino se describe que la Rubia Gallega es la raza que menos prevalencia presenta en esta zona (Sánchez-Andrade y cols., 2002). Estos datos sugieren que la prevalencia de la fasciolosis puede estar determinada por la raza y la edad de los animales. Por otro lado, la prevalencia en ovejas es del 83% en Galicia (Paz-Silva y cols., 2003). En la comunidad de Castilla y León, la prevalencia de la fasciolosis en ovino es de 59,3%. Concretamente en León, la prevalencia aumenta de un 26,7% entre los años 1992 y 1993 (Ferre y cols., 1995) a un 60,5% en el año 2013 (Martínez-Valladares y cols., 2013).

Por el contrario, en áreas más secas de España, como es Andalucía y, en concreto, Córdoba y Granada, tan sólo se detectó un 3% de fasciolosis caprina en los animales testados (Martínez-Moreno y cols., 1996). Los casos de zoonosis en España parecen estar infravalorados y, fundamentalmente, confinados al norte del país (Sorribes y cols., 1990), con casos importados y autóctonos más o menos recientes (Turrientes y cols., 2004).

2.2. CICLO BIOLÓGICO.

La existencia de *F. hepatica* está ligada a la presencia de su hospedador intermediario, caracoles del género *Galba* (anteriormente conocido como género *Lymnaea*), siendo *Galba truncatula* el hospedador intermediario principal en las zonas templadas de Europa (Figura 3a). Estos moluscos viven en las orillas de riachuelos, abrevaderos, charcas, praderas inundadas y, en definitiva, donde hay agua dulce de corriente lenta. Además, poseen un potencial biótico elevado, ya que un individuo suele producir hasta 25.000 caracoles nuevos en sólo tres meses, principalmente cuando la temperatura es cercana a los 22°C y con la humedad adecuada. En épocas secas y calurosas, los caracoles pueden estar, pero las fuentes, abrevaderos y, sobre todo, los regadíos, mantienen altas concentraciones (Mas-Coma y cols., 2009; Mas-Coma y cols., 2014).

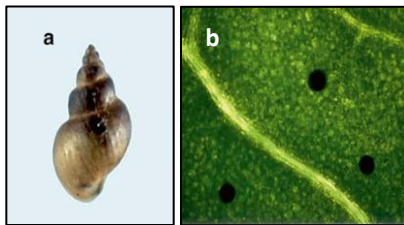


Figura 3. (a) Especimen del principal hospedador intermediario de Europa: *Galba truncatula*. (b) Metacercarias enquistadas en la superficie de una hoja de crecimiento en zonas acuosas. Fuente: Mas-Coma y cols., 2014.

Para desarrollarse, los huevos requieren temperaturas entre 10 y 30°C y la existencia de, al menos, una capa fina de agua. A partir de dos semanas crece una larva periciliada o miracidio, cuya parte anterior ensanchada lleva una papila cónica diminuta y una mancha ocular prominente, adelgazándose hacia la porción posterior y que mide 128 x 25 µm, aproximadamente. El miracidio móvil levanta el opérculo y comienza a nadar y, al ponerse en contacto con el caracol, pierde los cilios y se transforma en un esporocisto joven, que penetra en el molusco (De Haro-

Arteaga, 2004; Carrada-Bravo y cols., 2005). Después, el esporocisto maduro se multiplica y da lugar a redias germinales, las cuales son masas celulares muy activas, situadas dentro de la glándula digestiva (hepatopáncreas) o la cavidad corporal del molusco. Del caracol salen hacia el agua las cercarías, las cuales se enquistan sobre las hierbas y plantas acuáticas. Al perder la cola, aparecen las metacercarias (Figura 3b), envueltas por una cubierta polimérica de quinonas y otras sustancias mucilaginosas. Son muy sensibles a las altas temperaturas y a la desecación, pero soportan temperaturas muy bajas, posibilitando así la supervivencia invernal. Se ha estimado que por cada miracidio salen cerca de 250 cercarias (De Haro-Arteaga, 2004). Los rumiantes se infectan durante el pastoreo, de manera que ingieren las metacercarias vía oral y éstas se desenquistan en el tubo digestivo por acción de la bilis y otros jugos digestivos, dando salida a una forma juvenil del parásito, capaz de atravesar la pared intestinal hasta llegar al hígado. Cuando se aloja dentro de las vías biliares del hígado en su estadio adulto, se suele dar la copulación por pares o la autocopulación de un sólo adulto. Los hospedadores definitivos (herbívoros) eliminan los huevos desde los conductos biliares, llegan al intestino y salen por las heces. El parásito adulto pone entre 10.000 y 20.000 huevos al día, son de color amarillento, elipsoidales y con opérculo y unas medidas de entre 130 y 145 µm de largo y entre 70 y 90 µm de ancho. Una sola oveja afectada por la carga parasitaria biliar, podría eliminar entre 2 a 2,5 millones de huevos

diarios, además de los arrojados al ambiente por otros rumiantes y lagomorfos silvestres (liebres y conejos) (González-Lanza y cols., 1989).

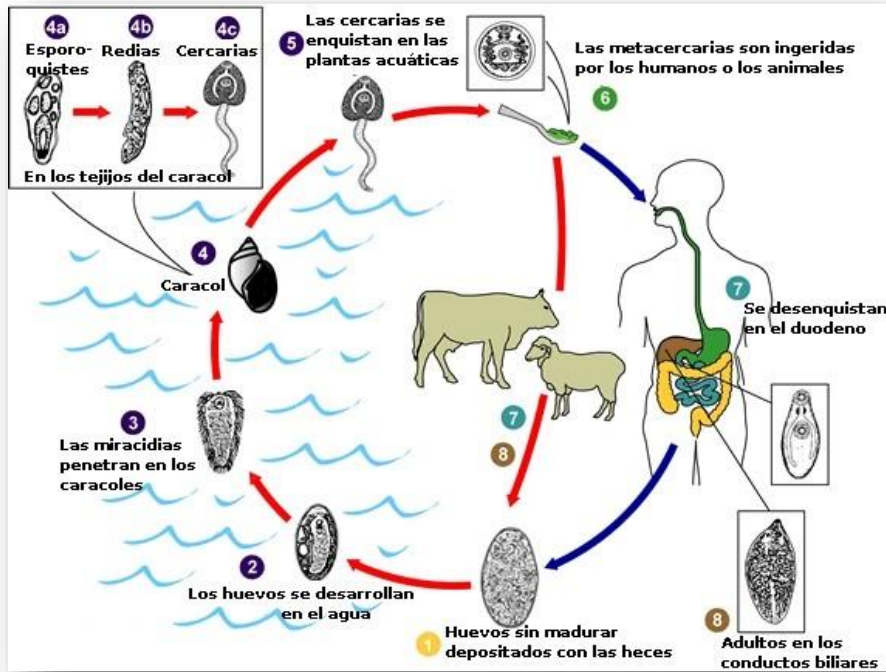


Figura 4. Ciclo biológico de *F. hepatica*. Los huevos de *Fasciola* inmaduros se descargan en las heces **1** y embrionan en el agua **2**, liberando los miracidios **3**, que invaden el hospedador intermediario (caracol) **4**. En el caracol, los parásitos sufren varias etapas de desarrollo (esporoquistes **4a**, redias **4b** y cercarias **4c**). Las cercarias se liberan del caracol y se enquistan como metacercarias en la vegetación acuática u otras superficies **5**. Los mamíferos adquieren la infección al comer vegetación que contiene metacercarias **6**. Las metacercarias se desenquistan y migran a través de la pared intestinal, la cavidad peritoneal y el parénquima hepático **7**, donde se convierten en trematodos adultos **8**. Imagen obtenida de Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (<https://www.cdc.gov/parasites/fasciola/biology.html>).

2.3. PATOLOGÍA Y PATOGENIA.

Debido a las importantes pérdidas económicas que la fasciolosis causa en el ganado ovino, se motivó durante los años 60 y 70 al estudio de su patogenia por parte de diferentes autores con el fin de comprender mejor el curso de esta enfermedad en ovinos (Sinclair, 1962; Ross y cols., 1967; Sinclair, 1968, 1970; Rusthon, 1977; Rusthon y Murray, 1977). En el caso de la patogenia en ganado caprino, sin embargo, los estudios son más limitados y recientes (Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999; Zafra y cols., 2013a y b).

La maduración y el crecimiento de los parásitos dentro del hospedador incluye un periodo de 12-16 semanas, periodo en el cual *F. hepatica* viaja a través del peritoneo y del hígado (Behm y Sangster, 1999).

Los estadios de migración de *F. hepatica* dentro del hospedador pueden clasificarse en dos: estadio prehepático y estadio hepático:

- Estadio prehepático:

Se inicia sobre las 72 horas postinfección (pi), después de haber sido ingeridas las metacercarias. En este momento, es posible encontrar formas parasitarias juveniles en la cavidad abdominal, después de haber atravesado la pared intestinal (Kendall y Parfi't, 1962). Normalmente, esta fase suele ser asintomática y no se han descrito lesiones peritoneales significativas, aparte de focos de necrosis y fibrosis, habiéndose demostrado de forma ocasional la migración ectópica de los parásitos a los pulmones, el cerebro y la piel (Boray, 1969; Catchpole y Snow, 1952).

Las formas juveniles recién desenquistadas de *F. hepatica* (NEJs/*Newly excysted juveniles*) son capaces de penetrar a través del intestino, siendo el intestino delgado la región anatómica concreta en la cual ha sido observado un mayor grado de migración (Hanna, 1980; Kawano y cols., 1991), sugiriendo que podría haber algunas características específicas, receptores o moléculas que el parásito es capaz de reconocer. El receptor de unión a la manosa es un receptor de la familia de las lectinas presente en las células epiteliales intestinales al cual se ha demostrado que se unen los NEJs (Unemura y cols., 2002, Kania y cols., 2010). También se ha documentado que proteasas específicas de *F. hepatica*, como son la catepsina L3 (FhCL3) y la catepsina B, tienen funciones específicas en la activación larvaria y en la penetración de la pared intestinal (Robinson y cols., 2009).

Una vez en la cavidad peritoneal, los NEJs van a interactuar con los leucocitos peritoneales de diferentes formas. Existen estudios que demuestran que 4 horas después de la inyección intraperitoneal en ratas de NEJs, provocan un considerable incremento de eosinófilos rodeando al parásito y llegando incluso a provocar su muerte (Duffus y Franks, 1980). Un estudio llevado a cabo por Carasi y colaboradores (2017), sugiere que el aumento en la expresión de la enzima hemo-oxigenasa 1 podría estar relacionada con la regulación de la respuesta inflamatoria en el hospedador asociada con los niveles de las citoquinas TGF- β e IL-10 que se encuentran en peritoneo, citoquinas inmunorreguladoras que podrían estar facilitando la supervivencia y el paso del parásito hacia el hígado.

- Estadío hepático:

Los parásitos comienzan a llegar al hígado a las 90 horas pi (Kendall y Parfit'it, 1962). Normalmente, los lóbulos hepáticos que están más próximos al intestino delgado (lóbulo izquierdo en el caso de los pequeños rumiantes, o lóbulo ventral en otras especies) suelen ser los más afectados, produciéndose una hipertrofia compensatoria de los lóbulos menos dañados (Sinclair, 1967). Dentro de este estadio, a su vez, se diferencian dos fases:

- Fase parenquimatosa o periodo migratorio agudo: Cuando las formas larvarias de *F. hepatica* terminan la migración peritoneal, penetran en la cápsula de Glisson del hígado y comienzan a migrar a través del parénquima hepático durante un tiempo aproximado de 6-7 semanas (Carrada-Bravo, 2007).
- Fase biliar o periodo biliar crónico: Se establece a partir de la 8^a-12^a spi, aunque es posible encontrar fasciolas de forma aislada en conductos biliares a la 4^a spi (Rushton y Murray, 1977). En esta fase, las formas ya adultas del parásito alcanzan los conductos biliares y la vesícula biliar. Al alojarse en el interior de los conductos biliares, el parásito produce su dilatación y engrosamiento, llegando a hacer prominencia sobre la cara visceral del hígado y llegando a producir, en ocasiones, obstrucción aguda del colédoco y síndrome de obstrucción biliar icterico. (Ross y cols., 1967; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Reddington y cols., 1986; Kelly, 1993).

La severidad de la enfermedad está condicionada por la magnitud de la carga parasitaria y de la pauta de reinfección y puede ser clasificada como aguda o crónica. La patología de la fasciolosis aguda sucede cuando un gran

número de metacercarias son ingeridas en un corto lapso de tiempo y se puede llegar a desarrollar una hepatitis hemorrágica necrotizante, con o sin hemoperitoneo, que puede llegar a ser mortal (Carrada-Bravo, 2007). Esto no sucede normalmente, salvo en ovejas y cabras. La forma crónica de la enfermedad es más común en todo tipo de huéspedes, a pesar de que existen considerables variaciones entre animales. Aquéllos que hayan ingerido pocas metacercarias permanecerán asintomáticos. Sin embargo, si la pauta de ingesta es frecuente puede dar lugar a procesos crónicos con marcada repercusión en las producciones cárnica, láctea y lanar, así como un descenso apreciable en la capacidad reproductiva (Behm y Sangster, 1999; Mulcahy y cols., 1999; Maqbool y cols., 2000; Schweizer y cols., 2005).

La complejidad de la fasciolosis surge de diferentes fuentes. La maduración del helminto involucra el desarrollo y crecimiento durante 12-16 semanas en las cuales *F. hepatica* migra a través de órganos. Cuando esto ocurre, el parásito crece y aumenta de tamaño y con ello también lo hacen el daño y la respuesta inflamatoria. Se ha descrito que el daño hepático causado por el parásito durante la fase migratoria se debe, principalmente, a la acción mecánica causada por las espinas y la ventosa oral. Sin embargo, es difícil evaluar el grado de importancia de las espinas sobre el daño hepático y si su ausencia disminuiría o no la irritación en conductos biliares (Behm y Sangster, 1999). En cuanto a la ventosa oral, es la vía a través de la cual *F. hepatica* obtiene la mayoría de los nutrientes. Mediante esta ventosa, los parásitos jóvenes perforan y destruyen los hepatocitos, aspiran los restos celulares hasta la faringe y los ingieren, lo que implica un considerable daño tisular (Dawes y Hughes, 1964). Otro mecanismo que contribuye al daño tisular son los denominados productos de excreción-secreción de *F. hepatica* (FhESP), los cuales se han descrito como productos

tóxicos liberados por el parásito, entre los cuales se han aislado diversas proteasas que ayudarían al parásito a digerir los tejidos adyacentes al mismo, facilitando la formación de los trayectos migratorios. Estos productos también producen necrosis de los hepatocitos (Kelly, 1993; Chauvin y Boulard, 1996) y son capaces de producir una disminución en su capacidad metabólica, especialmente de las enzimas microsomiales (Lenton y cols., 1996).

El nivel de infección es otro factor que afecta a la patología. Grandes parásitos causan una patología más severa y la posibilidad de la muerte del animal. Sin embargo, la mayoría de las infecciones tienen un curso crónico una vez que la *Fasciola* adulta se establece en los canalículos biliares (Behm y Sangster, 1999). La severidad de la patología también se ve afectada por el estado nutricional del animal. Asimismo, existen variaciones en la susceptibilidad a la infección y en la respuesta inmune contra *F. hepatica* (Mulcahy y cols., 1999), con ciertos huéspedes que poseen resistencia innata contra la especie. De manera que algunas especies, como la oveja (Sinclair, 1962; Ross y cols., 1967; Rusthon, 1977; Rusthon y Murray, 1977), el conejo (Urquhart, 1956) o el ratón (Dawes, 1961, 1963a, b), son bastante permisivas a la infección y la fase biliar es muy frecuente. En otras, sin embargo, como la humana (Chen y Mott, 1990), sobreviven pocos parásitos a la fase migratoria y su presencia en conductos biliares es menos frecuente.

En los casos concretos de la oveja (Pérez y cols., 2002) y la cabra (Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999), se ha demostrado que, infecciones experimentales con dosis pequeñas y repetidas (de manera similar a cómo se produciría en el medio natural), inducen lesiones hepáticas más severas que una única dosis infectante, aun cuando el número de

metacercarias totales administradas sea el mismo. Estos resultados sugieren que, en la oveja y la cabra, la respuesta inmunitaria local puede contribuir al daño hepático durante la fase migratoria. Se ha de tener en cuenta, al menos en pequeños rumiantes, la relación inversa existente entre la dosis infectante y la tasa de implantación de la misma (Kendall y Parfi'it, 1962), lo cual podría explicarse con fenómenos de competencia biológica entre las larvas juveniles o por el hecho de que, a mayor dosis infectante, más exacerbada es la reacción inmunitaria del hospedador (Boray, 1967).

2.3.1. Lesiones.

Las lesiones más evidentes relacionadas con *F. hepatica* se producen a nivel de hígado y nódulos linfáticos regionales. A pesar de que el mecanismo de invasión de las formas juveniles a través del intestino se encuentra aún en investigación, numerosos estudios avalan que la penetración de estos hacia la cavidad peritoneal se caracteriza por la ausencia de signos clínicos en el hospedador y encontrar signos patológicos o lesiones en esta fase constituiría un hecho puntual. Sin embargo, se ha descrito la presencia de pequeños focos de hemorragia en la cavidad peritoneal (Kelly, 1993). A nivel de la pared intestinal, no se observan lesiones o cambios patológicos, lo cual sugiere que el parásito atraviesa rápidamente estos tejidos o que posee un mecanismo que suprime la activación inmunitaria por parte del hospedador (Kendall y Parfi'it, 1962; Kelly, 1993; Zafra y cols., 2013a y b).

2.3.1.1. Lesiones en hígado.

Las formas juveniles de *F. hepatica* pueden causar peritonitis aguda y crónica en ovino y bovino en su fase de migración hacia el hígado. La inflamación incluye el peritoneo parietal y, en ocasiones, el peritoneo visceral, especialmente aquél del hígado, bazo y del omento. Los cambios pueden consistir en muchas placas de fibrina o en un engrosamiento más difuso. Las formas juveniles pueden encontrarse en las lesiones inflamatorias, tanto encima como debajo del peritoneo (Kelly, 1993).

Las lesiones producidas en el hígado se clasifican en dos grupos dependiendo de la fase evolutiva en la que se encuentre el proceso, de manera que el primer grupo coincide con la fase parenquimatosa o periodo migratorio agudo, dentro de las 6 primeras semanas post-infección (spi), en

la que se observa regeneración de hepatocitos y mínima fibrosis hepática. El segundo grupo, se corresponde con la localización de los parásitos adultos dentro de los conductos biliares y tiene lugar después de las primeras 6 spi y se asocia con la presencia de una empalizada única y periférica de células gigantes en los tractos parasitarios y con la formación de agregados de linfocitos de forma pseudofolicular. La presencia de los parásitos en los conductos biliares produce fibrosis de las paredes del conducto. Las paredes, sin embargo, permanecen flexibles y expandidas para acomodar al parásito y no se observan fenómenos de calcificación (fase biliar o periodo biliar crónico) (Dow y cols., 1968).

2.3.1.1.1. Lesiones en la fase parenquimatosa o periodo migratorio agudo**2.3.1.1.1.1. Lesiones macroscópicas.**

El tiempo que invierten las formas juveniles en llegar a la cápsula hepática dependerá de la especie hospedadora, así como de la virulencia de la cepa parasitaria, entre otros factores. Sinclair (1967), determinó que esto ocurría a las 90 horas post-infección en ovino. Sin embargo, ensayos experimentales han demostrado la llegada a las 48 horas. Las formas juveniles se empiezan a localizar bajo la cápsula del hígado de manera cada vez más abundante a partir de los 10 dpi en el caso de una primoinfección. Sin embargo, en las reinfecciones la llegada del parásito es más temprana, debido posiblemente a que se produce una migración más rápida (Sandeman y Howell, 1981; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995).

En la 1ª spi, se observa una moderada congestión del lóbulo hepático izquierdo, sin embargo, aún no se observan trayectos parasitarios. Entre la 2ª y la 3ª semana, se observan trayectos parasitarios de color blanquecino, de 0,5-2 mm de ancho y 5-15 mm de largo en la superficie del parénquima, principalmente en la cara diafragmática, debajo de la cápsula de Glisson. Estos trayectos fueron predominantes en el lóbulo izquierdo y más comúnmente observados en la superficie parietal del hígado. Al corte, el hígado presenta trayectos rojizos apreciables entre el parénquima hepático (Dow y cols., 1968; Zafra y cols., 2013a y b).

A partir de la 3ª spi, los trayectos parasitarios se vuelven de color amarillento y hacen un claro relieve sobre la superficie hepática, pudiendo tener un halo estrecho y blanquecino a su alrededor. La mayoría de estos trayectos miden 2 mm de ancho (Dow y cols., 1968).

En la 5ª spi, son visibles áreas de hemorragia adyacentes a los trayectos parasitarios superficiales (Dow y cols., 1968). En la 6ª spi, la mayoría de los trayectos han perdido su coloración amarillenta, se hacen más anchos (2-3 mm) y están llenos de sangre, lo que les confiere un matiz rojo oscuro. Es común observar placas hemorrágicas de mayor tamaño (hasta 1 cm) en la superficie visceral del lóbulo izquierdo. Debido a que el hígado presenta una superficie rugosa en esta fase, se favorece la aparición de adherencias fibrinosas con órganos adyacentes (Sinclair, 1967; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977).

Las lesiones descritas anteriormente pueden sufrir modificaciones según la carga parasitaria que reciban los animales. Según Ross y colaboradores (1967), se pueden distinguir infecciones severas (más de 5.000 metacercarias ingeridas) e infecciones moderadas (entre 700 y 1.000 metacercarias ingeridas), tomando como animal de referencia la oveja.

Normalmente, la mayoría de los parásitos alcanzan los conductos biliares. Sin embargo, algunos pueden quedarse enquistados en el parénquima hepático. Estos quistes están constituidos por un contenido oscuro formado por sangre, detritus y excrementos de *F. hepatica*, que con el paso del tiempo será rodeado por macrófagos, células gigantes multinucleadas y una cápsula de tejido conjuntivo. Finalmente, éstos se convertirán en quistes caseosos, los cuales pueden mineralizarse o ser invadidos por tejido fibroso (Kelly, 1993). En el caso concreto de las cabras, se ha descrito que las primeras lesiones hepáticas son la perihepatitis fibrosa y abundantes trayectos tortuosos, más severos en animales reinfectados que en los primoinfectados, afectando principalmente al lóbulo izquierdo (Pérez y cols., 1998).

2.3.1.1.1.2. Lesiones microscópicas.

Entre la 1^a y la 3^a spi, la migración de las formas juveniles de *F. hepatica* da lugar a túneles que contienen detritus celulares y sangre. Sin embargo, la hemorragia que se produce es leve, a excepción de algunos lugares debajo de la cápsula hepática. Los túneles por los que ha pasado el parásito contienen una masa compuesta por necrosis, detritus celulares y eosinófilos, rodeada en su periferia por una delgada capa de células hepáticas degeneradas, eosinófilos y macrófagos (Dow y cols., 1968; Zafra y cols., 2013a y b). En la periferia de los trayectos más antiguos el infiltrado de eosinófilos es más intenso, mientras que la zona central ha degenerado en una masa compuesta por detritus celulares embebidos en una matriz amorfa y eosinofílica (Dow y cols., 1968). Entre la 3^a y la 5^a spi, se forma otra capa periférica externa compuesta por células gigantes con un citoplasma eosinofílico y abundante, conteniendo de dos a veinte núcleos alargados y pálidos, con nucléolo prominente. Los espacios porta adyacentes tenían un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos y macrófagos y había un incremento en la hiperplasia de los canalículos biliares. (Dow y cols., 1968).

Posteriormente, la zona central de estos trayectos disminuye en tamaño y el infiltrado de eosinófilos disminuye, aumentando por otro lado el infiltrado de macrófagos y existiendo un pequeño número de linfocitos y fibroblastos y siendo los depósitos de colágeno discretos, que empiezan a aparecer principalmente a partir de la 6^a spi. A partir de entonces, aumenta la cantidad de colágeno hasta que los túneles se reducen a cicatrices anchas e irregulares que principalmente contenían macrófagos cargados con hemosiderina (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977).

La migración de los trematodos también provoca cambios vasculares, induciendo fenómenos de flebitis en los vasos sanguíneos y de trombosis en las venas hepáticas (Rushton y Murray, 1977). En las venas de los espacios porta, en la 1^a spi, se observa infiltrado de tipo mononuclear y, más adelante, eosinófilos y fluido edematoso. Como consecuencia, las venas porta quedan estenosadas, incluso de forma completa en algunas ocasiones (Rushton y Murray, 1977). Los eosinófilos y el edema presentes en los espacios porta se terminan diseminando por el parénquima cercano. Algunos hepatocitos empiezan a formar conductos biliares, los cuales son más numerosos en la 8^a spi. Cuando los trayectos hepáticos comienzan a cicatrizar, los eosinófilos disminuyen en número, hay menos edema y el infiltrado mononuclear aumenta en número hasta que alrededor de la 16^a spi se forman los nódulos linfoides (Rushton y Murray, 1977).

La cicatrización de los trayectos parasitarios se completa entre la 12^a y la 16^a spi, momento en el que la lesión es reemplazada por tejido fibroso. En la semana 16 todos los túneles están cicatrizados (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977). En la cabra y la oveja, los trayectos que han originado abundantes detritus celulares pueden tardar varias semanas más en ser reabsorbidos, permaneciendo con un centro necrótico acidófilo constituido por detritus celulares rodeados por células gigantes multinucleadas y células epitelioides, linfocitos, células plasmáticas y fibrosis periférica (Pérez y cols., 1999, 2003).

2.3.1.1.2. Lesiones en la fase biliar o periodo biliar crónico.**2.3.1.1.2.1. Lesiones macroscópicas.**

A pesar de que de manera esporádica se puede encontrar algún trematodo en los conductos biliares en la 4^a spi, la mayoría no suelen encontrarse en esta localización hasta la 12^a spi (Rushton y Murray, 1977). En la 6^a spi, la mayoría de los trayectos han perdido su coloración amarillenta, siendo éstos de mayor tamaño (2-3 mm) y estando llenos de sangre, lo cual les confiere un color rojo oscuro. En la 7^a semana, la mayoría de los trayectos siguen teniendo esta apariencia y, debido al aumento de carga parasitaria dentro de los conductos biliares, éstos van a estar dilatados y sus paredes engrosadas, con lo cual harán prominencia sobre la cara visceral del lóbulo izquierdo del hígado (Ross y cols., 1967; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray 1977; Reddington y cols., 1986; Kelly, 1993; Pérez y cols., 1999, 2003). A la 8^a semana, muchos trayectos han perdido su forma convexa y están desprovistos de contenido (Dow y cols., 1968). En las primoinfecciones de curso crónico se produce fibrosis periportal y proliferación y engrosamiento de los conductos biliares, que da un aspecto de pseudolobulillos a la superficie hepática (Meeusen y cols., 1995; Pérez y cols., 1999).

2.3.1.1.2.2. Lesiones microscópicas.

Los conductos biliares, sobre todo a partir de la 12^a semana, están elongados y dilatados y presentan una clara hiperplasia del revestimiento epitelial, estando rodeados además por gran cantidad de eosinófilos y células mononucleares (Rushton y Murray, 1977). Es frecuente que se produzca necrosis de la mucosa de los conductos que contienen los parásitos,

pudiendo extenderse en ocasiones a otras capas más profundas (Sinclair, 1967).

A partir de la 30^a semana, extensas áreas de epitelio han desaparecido, de manera que quedan expuestas las espinas y las ventosas de los trematodos. Los conductos que no contienen trematodos, pueden estar carentes también de epitelio o poseer una capa de células columnares regenerativas, la cual presenta una fibrosis marcada (Rushton y Murray, 1977). Meeusen y colaboradores (1995) señalan que esta fibrosis periportal es una lesión muy característica de las fases crónicas en infecciones primarias por *F. hepatica*, y que está acompañada de otro tipo de lesiones como proliferación de conductos biliares e infiltrado linfoplasmocitario. Estas lesiones implican la pérdida del parénquima hepático y la consiguiente alteración de la arquitectura normal del hígado.

Los huevos del parásito se identificaron por primera vez en conductos biliares de mayor tamaño a la 12^a semana, sin embargo, a la 20^a semana están alojando en conductos más pequeños y periféricos, donde no se encuentran trematodos adultos. En la 30^a semana, muchos huevos se localizan en el centro de una reacción granulomatosa en la cual no se pudo identificar la presencia de conductos biliares (Rushton y Murray, 1977).

La ruptura de la pared de los conductos biliares y de los vasos sanguíneos asociados, es un hecho común y que, frecuentemente, va asociado a la aparición de infartos (Ross y cols., 1967).

En cabras que han estado sometidas a dosis infectantes repetidas, se han descrito lesiones en hepatocitos consistentes en dilatación de retículo endoplasmático liso (Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999),

organela que cumple importantes funciones relacionadas con el metabolismo y detoxificación de numerosos tóxicos, y se ha sugerido que esta lesión podría estar originada por los FhESP

2.3.1.1.3. Lesiones en nódulos linfáticos.

Los nódulos linfáticos hepáticos (NLH) de animales infectados de manera natural o experimental con *F. hepatica* suelen mostrar un severo aumento de tamaño (Chauvin y cols., 1995). En el caso de infecciones severas, la médula aparece enrojecida al corte (Zafra y cols., 2008).

A nivel microscópico se demuestra que este aumento de tamaño del NLH observado macroscópicamente se debe a una hiperplasia de los folículos linfoides y de los cordones medulares, la cual oscila entre moderada y severa. También puede aparecer a veces, aunque en menor medida, una discreta hiperplasia de las áreas paracorticales. En cuanto al enrojecimiento medular observado macroscópicamente, se debe principalmente a focos hemorrágicos (agudos o crónicos), los cuales se asocian con la presencia de macrófagos cargados de hemosiderina. Con menor frecuencia, puede aparecer un leve infiltrado de eosinófilos en los cordones medulares y áreas paracorticales (Zafra y cols., 2008). Meeusen y colaboradores (1995), describen que en infecciones primarias con *F. hepatica*, hay un progresivo aumento en el curso de la infección tanto en el peso de los NLH, número de células y en el ratio CD4/CD8 de los linfocitos.

2.3.2. Alteraciones biopatológicas.

2.3.2.1. Anemia.

El tipo de anemia que la infección con *F. hepatica* produce se describe como una de tipo hemorrágica, debido a las lesiones que el parásito causa a nivel del parénquima hepático, conductos biliares y cavidad abdominal. Se estima que la cantidad de sangre que se puede perder oscila entre 0,2 y 0,5 ml por parásito y día (Dawes y Hughes, 1964; Jennings, 1976), siendo ésta probablemente el factor más importante en cuanto a morbilidad y mortalidad del hospedador con fasciolosis. Los estudios de Lotfollahzadeh y colaboradores (2008), determinaron que la anemia que aparece en la fasciolosis es de tipo normocítica hipocrómica, constatándose igualmente un descenso en los niveles de hierro sérico, lo cual se explicaría por la actividad hematófaga del parásito junto con la pérdida de sangre hacia el intestino a través de los conductos biliares.

2.3.2.2. Proteínas plasmáticas.

Las principales proteínas plasmáticas son la albúmina, las inmunoglobulinas (gamma-globulinas) y el fibrinógeno. El hígado es el único lugar en el que se sintetiza albúmina sérica, mientras que las inmunoglobulinas son producidas por las células plasmáticas en distintas partes del organismo. En la fasciolosis, se produce habitualmente hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (Behm y Sangster, 1999). Durante la fase parenquimatosa de la enfermedad, el daño causado por la migración de *F. hepatica* compromete la función hepática, provocándose una disminución en la producción de albúmina y disminuyendo su concentración plasmática (Anderson y cols., 1977; Dargie, 1981; Symons, 1989). Por otra parte, durante la fase biliar, la pérdida de albúmina debido a las hemorragias es

mayor a la reposición por síntesis hepática, produciéndose un desequilibrio. Esta hipoalbuminemia provoca un edema hipooncótico en zonas declives como la papada, dando lugar al típico edema submandibular (Rojo y Ferre, 1999; Behm y Sangster, 1999).

El incremento en la síntesis de inmunoglobulinas séricas tiene lugar a las pocas semanas de la infección y perdura a lo largo de todo el proceso, elevándose los niveles de IgM, IgG1, IgG2a e IgE (Holmes y cols., 1968; Sinclair, 1968, 1970; Berry y Dargie, 1976; Sykes y cols., 1980; Dargie, 1981; Huges y cols., 1981, Poitou y cols., 1992; Jemly y cols., 1993). En la cabra, dicho aumento ocurre a partir de la 3^a spi (Martínez-Moreno y cols., 1999).

Se ha demostrado que la infección gastrointestinal con *F. hepatica* hace que aumenten los niveles séricos de proteínas de fase aguda en cabras, especialmente de haptoglobina y la proteína amiloide sérica A (Ulutaş y cols., 2008).

2.3.2.3. Enzimas hepáticas.

La determinación de la concentración plasmática de algunas enzimas de origen hepático ha demostrado ser muy útil en el estudio y diagnóstico de hepatopatías en medicina veterinaria (Ferre y cols., 1994, 1995). Se ha observado que, en ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica*, tiene lugar un aumento significativo en los niveles séricos de la actividad glutamato-deshidrogenasa (GLDH) desde los 40 dpi y de la actividad de la aspartato aminotransferasa (AST) desde los 60 dpi. La actividad de ambas enzimas adquirió niveles máximos en el suero de los animales infectados a los 80 dpi, sin embargo, fueron decreciendo progresivamente a partir de este momento. Con respecto a los niveles en suero de gamma-glutamyltransferasa

(GGT), tuvo lugar un aumento significativo entre los días 80 y 120 pi. Además, se sugiere que el daño ocasionado por la migración de los parásitos a través del parénquima hepático, detectable en el suero por los niveles de AST y de GLDH, podría estar involucrado en el descenso de apetito en ovejas en este mismo periodo (Ferre y cols., 1994).

El incremento de la concentración plasmática de la GLDH, enzima mitocondrial de los hepatocitos, indica un proceso agudo reciente, el cual en infecciones por *F. hepatica* coincide con la fase migratoria del parásito, descendiendo su concentración cuando los parásitos alcanzan la madurez sexual y se localizan en los conductos biliares. Esta enzima es especialmente interesante en el estudio de la fasciolosis, ya que es específica del hepatocito, con lo cual un incremento en su concentración sérica será indicativo de daño a nivel del parénquima hepático, con mínimas interferencias por parte de otros procesos coexistentes (Sykes y cols., 1980; Ferre y cols., 1995, Raadsma y cols., 2007).

La concentración plasmática de las enzimas AST, alanina aminotransferasa (ALT) y sorbitol deshidrogenasa (SDH) también aumenta durante la migración del parásito por el parénquima hepático (Deger y cols., 2008), aunque dichas enzimas son menos hepatoespecíficas que la GLDH.

En el trabajo llevado a cabo por Martínez-Moreno y cols. (1999), se demostró que el crecimiento y migración de los parásitos es más rápido en las infecciones secundarias con *F. hepatica* en comparación con las infecciones primarias. Respecto a los niveles enzimáticos, se comprobó que el incremento en los niveles de AST y GLDH ocurre antes y se alcanzan, además, valores más elevados en los animales reinfectados. Chauvin y colaboradores (1995) también han descrito el mismo fenómeno en las

reinfecciones en ovejas y sugieren que se trata de un mecanismo de evasión inmune del parásito frente a la reacción hepática, por el cual las larvas migrantes en una reinfección son capaces de alcanzar más rápida y fácilmente los conductos biliares. La infección secundaria en cabras también induce un proceso patológico más marcado, implicando alteraciones hematológicas mayores y más duraderas, una severa disfunción hepática (indicada por los valores enzimáticos en suero) y lesiones hepáticas similares a las observadas en infecciones primarias, pero más extensas y severas (Martínez-Moreno y cols., 1997; Pérez y cols., 1998, 1999). En estos últimos trabajos citados se comprobó que, tanto en primoinfecciones como reinfecciones, en la especie caprina no existía correlación alguna entre la carga parasitaria y los niveles séricos de enzimas hepáticas. Estos mismos resultados han sido confirmados en ovejas infectadas por *F. gigantica* (Raadsma y cols., 2008).

2.4. INMUNOLOGÍA EN LA INFECCIÓN POR *F. hepatica*.

2.4.1. Introducción.

Dado que habitamos en un mundo potencialmente hostil en el que existen gran variedad de agentes infecciosos, el sistema inmunitario de los animales ha evolucionado de tal manera que puede proporcionar una defensa eficaz frente a un amplio espectro de éstos, donde se incluyen: bacterias, hongos, protozoos y parásitos; puntualizando que, en el caso concreto de los parásitos, más que una lucha eficaz por parte del hospedador se acaba instaurando una situación de “tregua incómoda” con el organismo hospedador y, en la mayoría de los casos, insatisfactoria (Roitt, 2001). Este mecanismo de defensa se denomina respuesta inmunitaria y se divide en dos tipos principales:

- Respuesta inmunitaria natural o innata: Este tipo de inmunidad constituye una respuesta rápida e inespecífica frente al agente invasor, sin necesitar de un contacto previo con éste. En esta respuesta se incluyen las barreras naturales externas, células que fagocitan agentes infecciosos (neutrófilos, macrófagos y células dendríticas), el sistema del complemento, células implicadas en la muerte extracelular (células NK (*Natural Killer*) y eosinófilos). Este tipo de respuesta inmunitaria es fundamental para el reconocimiento precoz de los agentes invasores y actúa como una fase previa al posterior desarrollo de la respuesta inmunitaria adquirida la cual, a su vez, modula y dirige al sistema inmunitario innato (Roitt, 2001).
- Respuesta inmunitaria adquirida: Debido a que muchos agentes infecciosos desarrollan estrategias para evadir la respuesta inmunitaria natural o innata, el organismo desarrolla un mecanismo

de defensa más específico, aunque más lento, el cual está mediado principalmente por linfocitos T y linfocitos B que, a su vez, actúan sobre varios elementos del sistema inmunitario (Roitt, 2001).

2.4.2. Respuesta inmunitaria natural o innata.

Las barreras defensivas naturales externas, como son la piel, el mucus, fluidos secretados por el organismo como el ácido gástrico en el tubo digestivo, la lactoperoxidasa en la leche y la lisozima en las lágrimas, son sólo un ejemplo del amplio rango y variedad de barreras físicas y de sustancias que el organismo produce para evitar la entrada de agentes infecciosos. Por lo general, estas barreras físicas son poco efectivas en los casos de infecciones por helmintos. Como ejemplo, las cercarías de los schistosomas segregan una serie de proteasas que degradan la matriz proteica de la piel para poder así entrar fácilmente (Dalton y Brindley, 1997). En el caso de *F. hepatica*, el mecanismo de desenquistamiento de metacercarias es un proceso activo que tiene lugar en el aparato digestivo y que consta de dos fases: primero, la activación tiene lugar con la exposición a altas concentraciones de dióxido de carbono, condiciones reductoras y una temperatura de alrededor de 39°C. En la segunda fase (fase de emergencia), las metacercarias necesitan contacto con la bilis del hospedador para desenquistarse y finalmente emerger (Dixon, 1966).

Si el patógeno consigue superar estas primeras barreras fisiológicas y penetra en el organismo, entran en juego dos acciones defensivas por parte de éste: la acción destructiva mediante factores químicos solubles, tales como sustancias bactericidas o citocidas y el mecanismo de fagocitosis (Roitt, 2001).

El sistema del complemento constituye uno de estos mecanismos defensivos con moléculas solubles y está formado por una veintena de proteínas que actúan como una cascada enzimática. Su activación resulta en una serie de productos capaces de lisis al agente invasor por ataque directo, formando poros en sus membranas. Además, la activación del sistema del complemento induce una respuesta inflamatoria y provoca la opsonización del agente, permitiendo su posterior fagocitosis por medio de granulocitos y macrófagos (Roitt, 2001).

El **neutrófilo y el macrófago** son las dos células fagocíticas por excelencia. El neutrófilo es una célula más pequeña que el macrófago, siendo el glóbulo blanco que más predomina en el torrente sanguíneo. Posee un núcleo multilobulado y una serie de gránulos con potente actividad antimicrobiana (Roitt, 2001). El macrófago deriva de promonocitos de la médula ósea los cuales, después de diferenciarse en monocitos sanguíneos, se acaban localizando en los diferentes tejidos del organismo como macrófagos maduros donde constituyen el sistema mononuclear fagocítico. Tienen un núcleo ovoide y están presentes en el tejido conectivo, alrededor de la membrana basal de pequeños vasos sanguíneos y en el pulmón (macrófagos alveolares), hígado (células de Kupffer), en los sinusoides esplénicos y en la médula de los nódulos linfáticos, donde se localizan de manera estratégica para eliminar y filtrar material extraño (Roitt, 2001).

Ambos tipos celulares pueden liberar sustancias que actúan directamente contra el agente invasor (sustancias citocidas) y actuar como células fagocíticas y producir determinados reactivos derivados del óxido nítrico (NO/*Nitric Oxide*) o especies activas de oxígeno: peróxido de hidrógeno y sus derivados (Roitt, 2001; Piedrafita y cols., 2007). Un estudio

llevado a cabo en cabras por Martínez-Moreno y colaboradores (2000), demostró una deficiente respuesta fagocítica por parte de los neutrófilos en animales infectados con *F. hepatica* comparada con los animales control y, además, dicha respuesta estuvo correlacionada con la carga parasitaria.

Las células fagocíticas poseen en su superficie un sistema de receptores capaces de reconocer determinados patrones moleculares que son comunes en un amplio rango de agentes infecciosos y que sirven también para diferenciar de lo propio. Estos receptores de reconocimiento de patrones (PRR-*Pattern recognition receptor*) reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs-*Pathogen-associated molecular patterns*) en los cuales se incluyen carbohidratos bacterianos o ácidos nucleicos. Mediante este mecanismo, se puede destruir directamente al agente, sin necesidad de una respuesta inmunitaria más elaborada y tardía (Roitt, 2001).

Los macrófagos poseen este tipo de receptores en su superficie y son capaces de reconocer la membrana externa de las bacterias Gram negativas. La estimulación de este receptor induce la síntesis por parte de los macrófagos de señales químicas o citoquinas, tales como las interleuquinas: IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 y el factor de necrosis tumoral (TNF), las cuales estimularán eventualmente el crecimiento de células colaboradoras o T-helper (Th) que orquestarán una respuesta inmune adquirida de tipo Th1. En el trabajo llevado a cabo por Mulcahy y colaboradores (1999), la inmunización con catepsinas procedentes de *F. hepatica* ha demostrado reducir la carga parasitaria en terneros, estando esta protección relacionada con una respuesta de tipo Th1.

El desarrollo del concepto de activación del macrófago, las clases de activación y el papel de los macrófagos en las infecciones por helmintos y por *F. hepatica* vienen detallados en las secciones pertenecientes al apartado 2.5. de la Revisión bibliográfica de la presente Tesis Doctoral.

Las **células dendríticas** (CDs), juegan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmunitaria. Representan las principales células presentadoras de antígeno (CPAs), por su capacidad para capturar, procesar y presentar antígenos de forma óptima a linfocitos T, además de generar respuestas inmunitarias específicas. Mediante recientes estudios se ha podido corroborar que estas células también son capaces de activar otros tipos celulares, como los linfocitos B, células NK, macrófagos o eosinófilos e, incluso, generar tolerancia inmunológica (Vázquez y cols., 2011). Las CDs residen mayoritariamente en nódulos linfáticos, aunque transitoriamente pueden estar presentes en órganos no linfoides. Además, poseen receptores de manosa similares a los de los macrófagos, los cuales sirven para reconocer e interiorizar glicoconjugados de microorganismos.

Mientras que el mecanismo por el cual las CDs activadas interaccionan con patógenos como virus, bacterias y protozoos es bien conocido, aún quedan muchas incógnitas por resolver sobre cómo estas células reaccionan ante organismos más complejos, como son los parásitos helmintos. En un principio se formuló la hipótesis de que los parásitos helmintos impedían la activación de las CDs. Sin embargo, se ha demostrado que los productos de excreción-secreción de helmintos (Balic y cols., 2004) y la exposición al parásito helminto *Schistosoma mansoni* hacen madurar selectiva y activamente las CDs, las cuales actúan como potentes presentadoras de antígenos y son capaces de generar una fuerte respuesta

inmunitaria de tipo Th2 (Jenkins y Mountford, 2005; Perona-Wright y cols., 2006).

Aunque se ha descrito que *F. hepatica* no produce lesiones considerables a niveles tanto intestinal como peritoneal, se ha demostrado que los parásitos claramente inducen una “presencia inmunológica”, ya que la composición celular del líquido peritoneal cambia con el curso de la infección, consistiendo principalmente en la infiltración de un gran número de células inmunitarias tales como linfocitos, macrófagos y, especialmente, eosinófilos (Zafra y cols., 2013a y b; Escamilla y cols., 2017).

Los **mastocitos** o **células cebadas** son células que están relacionadas con reacciones de hipersensibilización y alérgicas. Un estudio realizado por Vukman y colaboradores (2013) describe que el número de mastocitos aumenta tanto en la cavidad peritoneal como en los hígados de ratones infectados experimentalmente con *F. hepatica*. Sin embargo, la función de estos mastocitos no está realmente definida ni hay evidencia de que sea protectora en ratas (Van Milligen y cols., 1998). Estas células inflamatorias residen en tejidos que responden ante la activación tanto del sistema inmunitario innato como del adquirido produciendo y liberando diferentes mediadores inflamatorios presentes en sus gránulos citoplasmáticos (histamina, proteasas, carboxipeptidasas y proteoglicanos) y son también capaces de sintetizar prostaglandinas, leucotrienos y determinadas citoquinas como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) o interleuquina 4 (IL-4) (Prussin y Metcalfe, 2003). Además, son capaces de liberar determinadas sustancias activas contra los parásitos al unirse los complejos antígeno parasitario-IgE con sus receptores de IgE de alta afinidad (Gurish y cols., 2004; Yoshimoto y Nakanishi, 2006). Se estima que su papel es más

determinante en estadios iniciales de la infección con *F. hepatica* (Doy y cols., 1981; Wicki y cols., 1991; Van Milligen y cols., 1998). Sin embargo, en bovinos se ha descrito que, tras la infección con este parásito, existe escasa evidencia del incremento en el porcentaje de mastocitos (McCole y cols., 1998; Bossaert y cols., 2000), mientras que en la infección con *F. gigantica* en búfalos se ha establecido que existe un incremento en el número de mastocitos en el infiltrado inflamatorio hepático (Molina y Skerratt, 2005).

Existe un subtipo de células cebadas que reciben el nombre de leucocitos globulares, los cuales son un tipo de células inflamatorias cuya presencia se ha descrito principalmente a nivel interepitelial. Los niveles de este tipo celular aumentan en respuesta a infecciones por helmintos (Miller y cols., 1971; Vogel y cols., 2018), pudiendo estar relacionados con la disminución de los procesos de inflamación y sugiriendo que estas células podrían jugar un importante papel en la moderación de la patología inducida por helmintos (Vogel y cols., 2018). Parece que la aparición de este tipo celular puede estar relacionada con una exposición prolongada a antígenos, alterando la estructura granular de los mastocitos y dando lugar a los leucocitos globulares (Huntley y cols., 1984). En la especie caprina se ha descrito que los leucocitos globulares expresan receptores tipo $\gamma\delta$, los cuales son característicos de determinados linfocitos (Konno y cols., 1995).

Se ha descrito que, en respuesta a antígenos tipo proteasas, se puede inducir la degranulación de mastocitos y basófilos para secretar IL-4 y promover así la diferenciación de la respuesta Th2 (Sokol y cols., 2008). Con respecto a los niveles de basófilos en animales infectados con *F. hepatica*, se ha demostrado que éstos aumentan en ciervos infectados con el

parásito (Vengušt y cols., 2003) y en la sangre circulante de ratas aumenta a partir de la 2ª semana de infección con *F. hepatica* (Poitou y cols., 1993). En células cebadas peritoneales de ratas también se ha descrito activación y degranulación al ser incubadas con péptidos sintéticos del tegumento de *F. hepatica* (Trudgett y cols., 2003). También se ha descrito presencia de células cebadas en lesiones hepáticas de terneros en fases crónicas de la infección con *F. hepatica* (Bossaert y cols., 2000).

Las **células NK** (*Natural Killer*) presentan receptores en su superficie que pueden reconocer al agente invasor y provocar su citolisis (Fearon y Locksley, 1996). Jedlina y colaboradores (2011), señalan que las células NK citotóxicas aumentan en el líquido peritoneal de ratas infectadas con *F. hepatica* desde el 2º día post-infección (dpi). Sin embargo, a partir de los 4 dpi éstas tienden a decrecer, lo cual podría indicar un cambio de células NK citotóxicas a una repuesta de células NK reguladoras. En lo que respecta al hígado, las células NK se distribuyen de manera homogénea por todo el parénquima hepático en rata. Sin embargo, aunque después de la infección con *F. hepatica*, el número de estas células no varía, tienden a distribuirse alrededor de las venas centrolobulillares de los espacios porta. Las células NK pueden ser otra fuente de producción de IFN- γ y podrían no estar asociadas con los eventos relacionados con la formación de los granulomas en la infección por *F. hepatica* (Tliba y cols., 2002).

Dado que los helmintos constituyen parásitos de gran tamaño y no pueden ser fagocitados, se produce la intervención de un sistema de destrucción extracelular en el que participan los eosinófilos. Los eosinófilos son células polimorfonucleares con gránulos caracterizados por su afinidad por colorantes ácidos (Butterworth y David, 1981; Gleich y Loegering,

1984) y se caracterizan por estar presentes en episodios alérgicos y en respuestas inflamatorias frente a parásitos helmintos.

Los **eosinófilos** están involucrados en la homeostasis tisular, modulación de la respuesta inmunitaria adaptativa y en la inmunidad innata frente a ciertos microbios y cambios patológicos en desórdenes alérgicos. Las funciones de los eosinófilos incluyen: movimiento hacia áreas de inflamación, capturar sustancias, matar células, actividad antiparasitaria y antibacteriana, participar y mediar en reacciones alérgicas y modular respuestas inflamatorias. Los eosinófilos tienen receptores de superficie para el componente C3b del complemento y, al activarse dichos receptores, son capaces de generar metabolitos de oxígeno activo. Además, ciertos compuestos presentes en sus gránulos son capaces de provocar daños a nivel de la membrana del agente invasor (Kita, 2013).

La eosinofilia es uno de los cambios hematológicos más comunes en infecciones por *F. hepatica*, aunque no se ha correlacionado con protección (Raadsma y cols., 2007). Tanto los eosinófilos como los macrófagos han demostrado un importante papel de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos en ratas contra *F. hepatica* (Van Milligen y cols., 1998, Piedrafita y cols., 2007). En oveja también se ha demostrado que los eosinófilos juegan un papel clave en la respuesta protectora frente a *Fasciola*. Así, los eosinófilos aislados de glándula mamaria de ovejas de Indonesia de cola corta resistentes a *F. gigantica*, e infectadas con dicha especie de *Fasciola*, eran capaces de matar larvas de *F. gigantica* cuando eran incubados en su presencia y con suero de ovejas infectadas, pero no eran capaces de matar larvas de *F. hepatica*, a la cual son sensibles dicha raza ovina (Piedrafita y cols., 2007).

Parece ser que, dentro de los mecanismos de modulación de la respuesta inmune de *F. hepatica*, está la capacidad que tiene éste de inducir apoptosis en leucocitos del líquido peritoneal en estadios tempranos de la enfermedad, entre ellos en eosinófilos y macrófagos (Escamilla y cols., 2017; Guasconi y cols., 2012; Serradell y cols., 2007).

2.4.3. Respuesta inmunitaria adquirida o adaptativa.

La respuesta inmunitaria adquirida está mediada principalmente por dos poblaciones de linfocitos: los linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral y los linfocitos T, responsables de la inmunidad celular. En comparación con el sistema inmunitario innato, el sistema inmunitario adquirido se caracteriza por presentar especificidad, memoria y capacidad para discriminar entre antígenos propios y extraños (Roitt, 2001).

2.4.3.1. Inmunidad humoral (Linfocitos B).

Los linfocitos B se originan a partir de células hematopoyéticas de la médula ósea y poseen un receptor tipo inmunoglobulina, el cual le permite unirse al antígeno. Después del proceso de unión antígeno-receptor, el complejo es internalizado y el antígeno es procesado mediante escisión proteolítica en los endosomas. Los péptidos resultantes se unen a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II/*Major histocompatibility complex*) formando un complejo que es transportado a la superficie celular para ser “presentado”. Las moléculas del MHC-II se encuentran sólo en las CPAs, tales como las células dendríticas, fagocitos mononucleares, algunas células endoteliales, células epiteliales del timo y los propios linfocitos B. Al localizarse el complejo formado por el péptido derivado del procesamiento del antígeno junto con el MHC-II en la superficie del linfocito B, es reconocido por linfocitos T activados (Th), que segregan citoquinas que inducen a los linfocitos B a migrar a los folículos primarios de los nódulos linfáticos, dando así lugar a la aparición de los centros germinales, donde se acumulan en las extensas prolongaciones celulares de las células dendríticas foliculares. Éstas tienen la importante función de seleccionar las células B en los centros germinales, de manera que sólo aquellas que tengan un receptor BCR de alta afinidad y no autorreactivo, serán capaces de unirse a las células dendríticas foliculares y, por tanto, serán seleccionadas de manera positiva, mientras que las que presenten baja afinidad, morirán por apoptosis (Nierop y Groot, 2002).

Tanto las células dendríticas foliculares como los linfocitos T activados inducen a estos linfocitos B a diferenciarse en dos tipos de células diferentes:

- i) Células plasmáticas: Capaces de producir inmunoglobulinas (Igs) que son capaces de unirse al epítipo antigénico que originariamente se unió al receptor del linfocito B (Park y cols., 2004).
- ii) Células de memoria: las cuales son capaces de reconocer el antígeno y proliferar y acelerar las respuestas inmunes futuras frente al mismo tipo de antígeno (Clark y Ledbetter, 1994).

De las diferentes clases de Igs que existen, cabría destacar la inmunoglobulina M (IgM), la cual se produce en infecciones primarias tempranas ya que, aunque sus múltiples sitios de unión tengan una baja especificidad, son capaces de atrapar organismos infecciosos. Esta inmunoglobulina también es muy importante en la activación del sistema de complemento por la vía clásica. Cuando la respuesta inmune continúa en el tiempo, FDC y linfocitos T inducen a los linfocitos B a cambiar la producción de IgM por IgG. En humanos, la IgG está compuesta por varias subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Tanto la IgG1 como la IgG3 son particularmente efectivas en activar el sistema de complemento y en mediar las actividades de fagocitosis y de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En infecciones por helmintos y en enfermedades alérgicas, IgG4 podría desempeñar un papel inmunomodulador ya que interfiere con la activación del sistema del complemento y bloquea la actividad de IgE. La IgE está presente en concentraciones bajas en suero y también se han descrito receptores de tipo FcE en células cebadas para este tipo de inmunoglobulina, además de en eosinófilos, macrófagos y plaquetas, y podrían considerarse importantes en mediar la eliminación de parásitos helmintos vía IgE dependiente

(Butterworth, 1984; Hagan, 1993). La IgA parece estar implicada en la inmunidad a nivel de mucosas como la de los aparatos digestivo y respiratorio.

Los rumiantes, incluidos ovino y bovino, también poseen IgM, IgG, IgA e IgE, además de las subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Musoke y cols., 1986).

La infección con *F. hepatica* se caracteriza por un aumento en la IgG específica del parásito, la cual normalmente es detectable a las 4 spi y adquiere un pico máximo entre la 8^a y la 10^a spi (Salimi-Bejestani y cols., 2005; Martínez-Pérez y cols., 2014). De manera concreta, en la cabra los niveles de IgG específicas anti-FhESP comienzan a ascender en la 2^a spi después de la infección experimental con *F. hepatica* y se mantienen hasta la semana 20 (Buffoni y cols., 2010).

Diversos estudios se han llevado a cabo para determinar la cinética que siguen los linfocitos B en la fasciolosis. En el trabajo publicado por Chung y colaboradores (2012), se describe un acúmulo de linfocitos B CD19+ en el bazo de ratones infectados con *F. hepatica* en la 1^a spi. Zafra y colaboradores (2010) describieron que tanto las cabras infectadas con *F. hepatica* como las infectadas y vacunadas mostraron una respuesta inmunitaria caracterizada por la infiltración de linfocitos T CD4+ y CD8+ y células plasmáticas IgG (+) en lesiones hepáticas y en la corteza de nódulos linfáticos hepáticos. De manera similar, también se produce un infiltrado de células plasmáticas en los hígados de búfalos y terneros infectados experimentalmente con *Fasciola gigantica* (*F. gigantica*) (Molina y Skerratt, 2005). En bovinos infectados experimentalmente con *F. hepatica*, también se ha descrito una producción temprana de IL-4, así como la

producción continuada de IgG1, las cuales hacen que la respuesta inmunitaria se torne en Th2 de manera crónica (Flynn y Mulcahy, 2008). En el caso de ovejas infectadas con *F. hepatica*, se describió un incremento del 11% en el número de linfocitos B reclutados a nivel de nódulos linfáticos hepáticos (Meeusen y cols., 1995). En el caso de las ratas, se produce un incremento general de IgG1, IgG2 y de IgE durante las 10 primeras spi y sólo se observa un descenso de IgM (Poitou y cols., 1993), mientras que en un periodo de tiempo más prolongado (7-12 semanas) tan sólo la IgG1 y la IgG2 se mantuvieron por encima de niveles basales (Gironès y cols., 2007). Se ha demostrado que, en bovino, el balance de isotipos de IgG es a favor de IgG1 sobre IgG2 en la infección con *F. hepatica*, a pesar de que tanto en bovino como en ovino el isotipo IgG2 se asocia con la expresión de resistencia o protección contra la infección (Golden y cols., 2010, Pleasance y cols., 2011). Fu y colaboradores (2016) hipotetizan que este sesgo de isotipo en ovejas es atribuible al efecto de atenuante que tienen las interleuquinas IL-18 e IL-12 sobre las células B. La IgG2a parece ser la responsable, junto con los eosinófilos, en mediar la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos en ratas (Van Milligen y cols., 1998), mientras que en bovino, la protección asociada a la vacunación experimental se basa en una elevada IgG2a. En ovinos vacunados y sin protección significativa se ha observado unos valores más elevados de IgG1 que de IgG2 específicas para los antígenos vacunales (Buffoni y cols., 2012), mientras que en ovinos (Maggioli y cols. 2011, Villa Mancera y Méndez-Mendoza, 2012) y caprinos (Villa Mancera y cols., 2014) vacunados y con protección significativa se han observado niveles elevados tanto de IgG1 como de IgG2 específicas, lo que indicaría una respuesta mista Th1/Th2.

2.4.3.2. Inmunidad celular (Linfocitos T).

Los linfocitos T, al igual que los linfocitos B, derivan de células hematopoyéticas de la médula ósea pero, a diferencia de éstos, primero deben madurar en el timo antes de migrar hacia el bazo y los nódulos linfáticos. En su superficie poseen el denominado receptor de antígeno de linfocitos T (TCR/*T cell receptor*), el cual es capaz de reconocer antígenos peptídicos unidos a MHC (Roitt, 2001). El receptor TCR es una proteína heterodimérica que puede estar compuesta por cadenas $\alpha\beta$ (TCR-2) o bien por cadenas $\gamma\delta$ (TCR-1) y permite a los linfocitos T reconocer una gama muy amplia de anticuerpos (Mulcahy y cols., 1999; Roitt, 2001).

2.4.3.2.1. Linfocitos $T\alpha\beta+$ o TCR-2.

Los linfocitos TCR-2, dependiendo de la función que realizan, se subdividen a su vez en linfocitos T citotóxicos (Tc), los cuales expresan el marcador CD8 en su superficie, y los linfocitos T colaboradores (Th), caracterizados por expresar el receptor CD4, y linfocitos T reguladores (Tregs), que son CD4+ CD25+.

Los linfocitos Tc CD8+ son efectivos en la eliminación de virus, bacterias o células del hospedador infectadas por protozoos y células tumorales vía contacto directo célula-célula y liberando el compuesto tóxico llamado perforina, además de radicales de oxígeno, como son el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete. Los antígenos procedentes del agente infeccioso intracelular son procesados en los endosomas y presentados en asociación con moléculas del MHC-I por los TCR en los linfocitos Tc CD8+ y, este proceso inicia la eliminación del agente. Por lo general, los linfocitos Tc no son capaces de mediar la eliminación de parásitos eucarióticos extracelulares, como son los

helminos. Los linfocitos Th CD4+, por su parte, ayudan en la proliferación de los linfocitos B y en la secreción de anticuerpos por parte de estos, actividad mediada por MHC-II (Mulcahy y cols., 1999).

Existe una población de linfocitos denominada linfocitos T reguladores (Tregs), los cuales expresan predominantemente CD4+ y puede presentar en su superficie la cadena IL-2R α o expresar el factor de transcripción de FoxP3, o ambos (Gavin y cols., 2007).

Estos linfocitos pueden resultar, en ocasiones, beneficiosos para el hospedador, ya que permiten una disminución de la inmunopatología asociada a enfermedades autoinmunitarias, así como a la sensibilidad a determinados patógenos (Belkaid y Tarbell 2009).

2.4.3.2.1.1. Subtipos de linfocitos T colaboradores (Th1, Th2 y Th17) y su papel en infecciones por helmintos y por *F. hepatica*.

Durante la década de 1980 se profundizó en el conocimiento de la funcionalidad de los linfocitos T y se identificaron 2 tipos de respuestas colaboradoras atendiendo al perfil de citoquinas que producían (Mossman y cols, 1986; Mossman y Coffman, 1989a y b): la respuesta Th1, la cual es altamente efectiva en la eliminación de patógenos intracelulares, y la respuesta Th2, de gran importancia en la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos (Abbas y cols., 1996). Los linfocitos Th1 son secretores de interferón gamma (IFN- γ) e IL-2 y los Th2 liberan IL-4 e IL-13 (Mossman y Coffman, 1989b).

Recientemente, se ha descubierto un tercer tipo de células colaboradoras llamadas Th17, cuya identificación surgió tras comprobar que las células T tratadas con péptidos microbianos en presencia de *Borrelia*

burgdorferi (el agente de la enfermedad de Lyme) producían IL-17, pero a esta citocina no la elaboran las Th1 ni las Th2, lo que implica la existencia de un nuevo subgrupo de linfocitos T (CD4+) que secretan IL-17 y que coordinan la respuesta inmune de un modo diferente a las Th1 o a las Th2 (Infante-Duarte y cols., 2000). Estas células Th17 desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos. Asimismo, se ha descrito para ellas un efecto proinflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Betelli y cols., 2007; Matsuzaki y cols., 2007).

- Linfocitos Th1: Los macrófagos también pueden estimular a la diferenciación de los linfocitos T mediante la presentación de los antígenos-MHC-II en su superficie, induciendo a estos últimos y a las CDs a liberar IL-2, la cual en combinación con IL-15 procedente de los macrófagos activados, estimula a las células NK a producir IFN- γ el cual, a su vez, puede aumentar la producción de IL-12 mediante la estimulación de receptores de IL-12 en linfocitos T y en células NK (Trinchieri y cols., 2003; Martín-Fontecha y cols., 2004). De esta manera, se establece un feedback positivo en el que se amplifican los niveles de IFN- γ , que activan macrófagos, y de IL-12 y IL-18, los cuales activan linfocitos Th1 y NK y, eventualmente, lleva a una respuesta inmunitaria de tipo Th1 (Fearon y Locksley, 1996; Bohn y cols, 1998). Este tipo de eliminación de patógenos por medio de macrófagos activados en el que no median anticuerpos, está asociado con la inmunidad mediada por células frente a organismos intracelulares tales como ciertos virus, bacterias y protozoos, aunque puede ser también efectiva contra organismos extracelulares como helmintos. Es el caso del trabajo publicado por

James y colaboradores (1982), el número de leucocitos peritoneales aumentó de forma dramática en ratones infectados de forma experimental con *Schistosoma mansoni*, estando estos representados en un 65% por macrófagos y exhibiendo estos últimos una actividad tumoricida no específica y significativa *in vitro*.

- Linfocitos Th2: Los tipos celulares y las citoquinas involucrados en la diferenciación de las células Th2 no están bien definidos. Se ha establecido que la IL-4 es esencial para la diferenciación de las células de Th2, (Mowen y Glimcher, 2004), aunque la fuente de esta citoquina es aún incierta. Sin embargo, se ha establecido que probablemente se produzca por parte de macrófagos y de algunas células T que se estimulen vía linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ intraepiteliales, que son capaces de liberar citoquinas ante determinados estímulos (Fearon y Locksley, 1996; Ferrick y cols., 2000). Los linfocitos Th2 promueven un tipo de respuesta inmunitaria denominada respuesta inmunitaria de tipo Th2, en la que se producen las citoquinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 las cuales, a su vez, promueven la proliferación de linfocitos B y la secreción de IgA, IgG e IgE. Además, intervienen en la activación de las células cebadas y de los eosinófilos. Los eosinófilos se unen a la superficie del parásito por medio de anticuerpo, concretamente de IgE, de manera que pueden activarse y liberar componentes catiónicos altamente tóxicos. Las respuestas colaboradoras de tipo Th2 son de gran importancia en la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos (Abbas y cols., 1996).

- Linfocitos Th17: La diferenciación de células Th17 está mediada por IL-23 producida por las CDs, entre otras citoquinas, como la IL-6 (Acosta-Rodríguez y cols., 2007; LeibundGut-Landmann y cols., 2007). La IL-23 es una citoquina proinflamatoria compuesta por las subunidades p19 y p40, siendo esta última compartida con la IL-12. Ambas interleuquinas tienen diferentes receptores y efectos. Mientras que la IL-12 induce el desarrollo de las células Th1, la IL-23 induce la diferenciación de células T CD4⁺ en células Th17 en un contexto proinflamatorio y, especialmente, en la presencia de TGF- β e IL-6. Estas células Th17 producen IL-17, IL-17F, IL-6, y TNF- α , pero no IFN- γ e IL-4. Los macrófagos inflamatorios se activan mediante IL-23 para producir IL-1, TNF- α , e IL-23 (Duvall et al., 2011; Iwakura e Ishigame, 2006). Se ha demostrado que si se bloquea la producción de IL-23 o de IL-17 e IL-6, pero no de IL-12/IFN- γ , se suprime de manera significativa el desarrollo de enfermedades crónicas inflamatorias (Iwakura e Ishigame, 2006). La exposición de CDs al parásito *F. hepatica* ha resultado en una reducción de los niveles de IL-23. (Dowling y cols., 2010). Sin embargo, los huevos de helmintos de schistosoma, inducen una inflamación granulomatosa hepática grave que es impulsada por células Th17, que han sido estimuladas a su vez por IL-1 β e IL-23 producidas por CDs (Kalantari y cols., 2018).

Tanto la respuesta Th1 como la Th2 se encuentran fuertemente asociadas proporcionando inmunidad frente a helmintos, sin embargo, decrece la resistencia frente a micobacterias y otros organismos intracelulares (Tizard, 2012). Se ha establecido que estos dos tipos de respuestas tienden a regularse de forma negativa una respecto a la otra

mediante la acción de citoquinas. Concretamente, parece ser que la citoquina INF- γ , propia de la respuesta Th1, inhibe las respuestas de tipo Th2. De la misma manera, las citoquinas IL-4, IL-10 e IL-13 pueden inhibir los efectos de INF- γ y el desarrollo de respuestas Th1. En el caso de algunas infecciones por parásitos, se ha demostrado que el estímulo de una respuesta Th2 puede suprimir la respuesta Th1 (la cual potencialmente daña el tejido) (Pritchard y cols., 1997).

Las infecciones por helmintos se caracterizan por inducir una respuesta inmunitaria de tipo Th2 con producción de IL-4 sobre IFN- γ , ofreciendo protección y estando relacionada con descensos en las cargas parasitarias, así como en la severidad de la parasitosis (Pleasance y cols., 2011). La mayoría de las infecciones por nematodos siguen este escenario, sin embargo, en el caso de las infecciones con trematodos, como es el caso de *S. mansoni*, ambas respuestas Th1 y Th2 se han asociado con la protección (Dessein y cols., 2004; McManus y Loukas, 2008).

El hecho de que determinados helmintos provoquen una respuesta inmunitaria Th2, de la cual a su vez son capaces de protegerse, está relacionado con la evasión de los mecanismos defensivos potencialmente tóxicos dependientes de una respuesta Th1 (Finkelman y cols., 1991; Pearce y Sher, 1991; Allen y Maizels, 1997). Como un claro ejemplo de mecanismo dependiente de una respuesta inmunitaria de tipo Th1 que se muestra eficaz frente a los procesos parasitarios, cabría destacar la acción citotóxica realizada por los macrófagos. Estas células, una vez activadas por la acción de diferentes citoquinas, intervienen como células efectoras en la inmunidad protectora frente a un amplio rango de parásitos protozoarios y helmintos (Mulcahy y cols., 1999). Sin embargo, se ha demostrado que, durante la

migración de las formas juveniles de *F. hepatica* a través del intestino y peritoneo hacia el hígado, no se induce un efecto citotóxico de los macrófagos *in vitro* (Piedrafita y cols., 2007).

En el caso de la fasciolosis, se ha demostrado que en las fases de infección temprana (en el ámbito tisular o biliar), *F. hepatica* produce una potente polarización hacia una respuesta de tipo Th2 y Treg (células reguladoras que controlan la exacerbación de los procesos inflamatorios), coincidente con una supresión de las citoquinas de Th1 (O'Neill y cols., 2000 y 2001; Donnelly y cols., 2005; Flynn y cols., 2007; Donnelly y cols., 2008; Dowling y cols., 2010). Esta respuesta Th2 es incapaz de eliminar o de detener al parásito (Mulcahy y cols., 1999), por lo que no supone un obstáculo para la migración. El parásito podría polarizar la respuesta del hospedador hacia una repuesta Th2 para así defenderse de una Th1, la cual podría resultar más eficaz para controlar al parásito (Maizels y Holland, 1998; Maizels y cols., 2004) pero, aunque exista polarización hacia una respuesta Th2, el parásito es capaz de ejercer tal efecto inmunomodulador que hace que el hospedador desarrolle una respuesta inmunitaria de tipo no protectora, favoreciendo la instauración definitiva y continuada en el tiempo en el hospedador (Vukman y cols., 2013; Adams y cols., 2014; Rodríguez y cols., 2015). En un estudio de transcriptómica en hígado de animales infectados con *F. hepatica*, se han encontrado genes que intervienen en procesos ligados con la regulación de la diferenciación de una respuesta inmunitaria de tipo Th2, así como con la activación de los linfocitos B (Álvarez-Rojas y cols., 2015).

Sin embargo, aunque se produce una respuesta de tipo Th2 en la infección por *F. hepatica*, se han detectado niveles bajos o incluso ausentes

de la citoquina IL-4. En ratones infectados con este parásito, se detectaron bajos niveles de transcripción de IL-4 a los 14 dpi (Donnelly y cols., 2005). En el trabajo realizado por Walsh y colaboradores (2009), ratones experimentalmente infectados con *F. hepatica* sufrieron un reclutamiento en la cavidad peritoneal de células T CD4 (+), las cuales secretan IL-10, pero no IFN- γ o IL-4. Pacheco y colaboradores (2017) analizaron la expresión de IL-4 mediante PCR a tiempo real (qPCR) en el hígado y nódulos linfáticos de ovejas infectadas con *F. hepatica*, detectándose que el nivel de ésta incrementa a los 9 dpi y, con mayor intensidad, a los 18 dpi. Se ha sugerido que la transcripción de IL-4 podría estar inhibida por TGF- β , como se ha observado en la infección por *N. brasiliensis* en ratón, donde el TGF- β derivado de los T reguladores contrarresta la expresión de IL-4 (Macey y cols., 2010).

Este ambiente inmunomodulado por *F. hepatica* induce a la diferenciación de células T reguladoras (Walsh y cols., 2009), la activación alternativa de macrófagos (Flynn y cols., 2008) y la modulación de la actividad de las células dendríticas y de las células cebadas (Hamilton y cols., 2009; Falcón y cols., 2010; Vukman y cols., 2013).

En esta inmunomodulación podrían intervenir diferentes productos. Un ejemplo serían los productos de excreción-secreción (ESP), sustancias que excreta y secreta *F. hepatica* (FhESP) y que interactúan con el hospedador en un contexto inmunogénico. Algunos de estos ESP consisten en proteasas que ayudan a degradar las proteínas del hospedador (Yamasaki y cols., 1992; Smith y cols., 1993; Carmona y cols., 1994). Los FhES contienen moléculas moduladoras que ayudan al mantenimiento de este ambiente inmunomodulado, además de inducir a los macrófagos

peritoneales de ratones a cambiar su fenotipo hacia uno de tipo alternativo (M2) o regulador (Lund y cols., 2014) o de disminuir la producción de la citoquina TNF- α (Baška y cols., 2017).

La interacción de los FhESP con los macrófagos se considera crucial en etapas tempranas de la infección. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que los FhESP podrían inducir a la expresión de un fenotipo M2 y un incremento en la actividad de la enzima arginasa en macrófagos peritoneales en ratón, caracterizado por la producción de altos niveles de IL-10 y de TGF- β y bajos niveles de IL-2 (Donnelly y cols., 2005; Guasconi y cols., 2011). Tanto la IL-10 como la TGF- β son importantes en la regulación de las respuestas inmunitarias y juegan un papel principal en minimizar la patología e inducir fenómenos de reparación tisular en las infecciones por helmintos (Belkaid y cols., 2006). Todo esto se traduce en que el parásito tiene efectos inmunomoduladores en los macrófagos de manera que esto puede constituir un evento crucial en extender la supervivencia del parásito en el hospedador (Guasconi y cols., 2011).

Otra molécula secretada por *F. hepatica* es la molécula de defensa de los helmintos-1 (FhHDM-1/*F. hepatica* *helminth defense molecule-1*). Cuando esta molécula es administrada en ratones vía parenteral, interactúa con los macrófagos, reduciendo su capacidad de producir citoquinas inflamatorias, como TNF e IL-6 (Lund y cols., 2016).

El tegumento externo de *F. hepatica* (FhTeg) se ha designado como otro mecanismo inmunomodulador del parásito. Éste es secretado cada 2-3 horas por el parásito, lo cual actúa como una fuente constante de antígeno y consiste en una capa activa que está en contacto íntimo con los tejidos y fluidos del hospedador (Cameron y cols., 2017). Estudios han demostrado

que, a través de la producción y liberación de este FhTeg, *F. hepatica* también libera inmunocomplejos que sirven para evadir la respuesta inmunitaria inflamatoria o Th1 del hospedador (Halton, 2004; Mulcahy y cols., 1998).

Parece ser que el FhTeg también podría tener un efecto sobre la maduración y función de las CDs y de los mastocitos, pudiendo llegar a suprimir la maduración y función de las CDs, suprimiendo respuestas inflamatorias (Hamilton y cols., 2009) e induciendo al desarrollo de fenotipos que se caracterizan con una producción decreciente del panel de citoquinas proinflamatorias y una expresión reducida de marcadores de coestimulación, resultando todo esto en una incapacidad de las CDs y los mastocitos de estimular y activar a las células T (Adams y cols., 2014).

En cuanto a la respuesta temprana frente a la fasciolosis, un trabajo realizado en ganado vacuno por Clery y Mulcahy (1998), concluyó que la infección con *F. hepatica* daba lugar a una proliferación de linfocitos con rápida producción de IFN- γ , lo que era indicativo de un patrón Th1 en las fases iniciales del proceso. Si extrapolamos la dicotomía Th1/Th2 que tiene lugar en ratones (Pearce y Sher, 1991), la detección de IFN- γ en las primeras fases de la infección y su ausencia en infecciones crónicas, demostraría la polarización de la respuesta en función del curso de la infección, permitiendo la supervivencia de parásito durante las fases crónicas de la infección. En el trabajo llevado a cabo por Pacheco y colaboradores (2017), se describe una disminución gradual desde el 1 dpi de la citoquina IFN- γ en nódulos linfáticos de ovejas infectadas con *F. hepatica*.

2.4.3.2.2. Linfocitos T $\gamma\delta$ + o TCR-1.

Los linfocitos T $\gamma\delta$ + son CD4-/CD8- y representan una pequeña población de linfocitos T en la mayoría de los animales. Se le han atribuido diversas funciones, como la intervención en la producción de citoquinas, la presentación de antígenos y la regulación de la respuesta inmunitaria (Pang y cols., 2012; Kabelitz y cols., 2013). Sin embargo, en la especie bovina se encuentran ampliamente representados, llegando a constituir más del 60% de los linfocitos T en la sangre circulante (Davis y cols., 1996) y pudiendo llegar a representar el mayor complejo de células T a este nivel, ya que proliferan en respuesta a IL-10, TGF- β y al entrar en contacto con las CPAs (Guzmán y cols., 2014).

Estos linfocitos son escasos en los órganos linfoides periféricos, como el bazo o nódulos linfáticos de animales normales. Sin embargo, son la población linfoide dominante en los epitelios (Janeway y cols., 1988). Así pues, se ha demostrado la existencia de subpoblaciones de estas células en superficies epiteliales como la piel, glándula mamaria e intestino (Wyatt y cols., 1994; Navarro y cols., 1996; Girardi y cols., 2006). De manera que los linfocitos T $\gamma\delta$ + son los responsables de mantener la vigilancia inmunológica a nivel epitelial, monitorizando la integridad de los epitelios mediante el reconocimiento y destrucción de aquellas células alteradas, las cuales expresan en determinadas ocasiones, como en casos de infecciones y/o neoplasia, un tipo molecular específico de MHC-I (Girardi y cols., 2006).

2.5. DESARROLLO DEL CONCEPTO DE ACTIVACIÓN DEL MACRÓFAGO.

Los fagocitos mononucleares son producto de un proceso denominado monocitopoyesis que comienza con la generación de precursores mieloides que, al ser estimulados con el factor estimulador de colonias granulocíticas-monocíticas (GM-CSF/*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) y el factor estimulador de colonias de macrófago (M-CSF/*Macrophage colony-stimulating factor*) e interactuar con el estroma de los órganos hematopoyéticos, dan lugar a los promonoblastos y generan la progenie monocito-macrófago (Rutherford y cols., 1993). Los monocitos abandonan la médula ósea, entran al torrente sanguíneo y se dirigen a los diferentes tejidos por el influjo de quimiocinas. En los tejidos, los monocitos se convierten en macrófagos residentes con un fenotipo determinado por el ambiente tisular. Esta especialización contribuye al desarrollo de su heterogeneidad, la cual se ha definido como la propiedad de los macrófagos de expresar amplios rangos de fenotipos morfológicos y funcionales (Turpin y López-Berestein, 1993).

El estudio de los patrones de activación de los macrófagos se ha convertido en un tópico de gran impacto en los últimos años. Aunque actualmente se habla de diferentes estados de activación, entre los que se encuentran el clásico (M1) y el alternativo (M2), no está del todo claro cuáles son los inductores, las propiedades funcionales y el repertorio molecular de cada uno de estos grupos de macrófagos, ya que las definiciones de los diferentes fenómenos asociados a la activación varían entre los sistemas experimentales. Sólo hasta hace poco el papel de la heterogeneidad y la diferenciación del macrófago ha sido tomado en cuenta en la definición de los diferentes fenotipos de activación, con lo cual se ha

comenzado a comprender que los macrófagos activados son un grupo de células mucho más amplio y versátil, que llevan a cabo distintas funciones, resultado de un conjunto de acciones de diferenciación, maduración y activación (Duque Correa y Rojas, 2007).

La activación del macrófago fue descrita inicialmente como un “estado alterado” en el cual se presentaba un incremento en la actividad bactericida de macrófagos esplénicos de ratones inmunizados e infectados con bacterias facultativas intracelulares como *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus* y *Mycobacterium tuberculosis* en comparación con los macrófagos de ratones no inmunizados (Mackaness, 1962 y 1964). Los macrófagos activados, en contraste con los no activados, se caracterizaban por los cambios de la membrana plasmática, que incluían un aumento en el contenido de colesterol (Kondo y Kanai, 1977), de fosfodiesterasa alcalina 1 (Cohn, 1978), disminución de la exto-5’ nucleotidasa (Karnovsky y Lazdins, 1978) y un incremento en el número de fagolisosomas y vesículas endocíticas (North, 1978). Además, en respuesta a la inflamación o a la infección microbiana *in vivo*, o a las linfocinas *in vitro*, secretaban altas cantidades de proteinasas neutras (Gordon, 1976), que incluían el activador del plasminógeno, elastasa y colagenasa, presentaban un incremento en las actividades de las hidrolasas ácidas (Hard, 1970; Saito y Suter, 1965) y un alto consumo de oxígeno durante la fagocitosis (Karnovsky y cols., 1975).

El descubrimiento de que las células T contribuían a la activación del macrófago, y la identificación de INF- γ como la citoquina capaz de activar al macrófago (Schreiber, 1984), contribuyó al establecimiento del concepto de que la calidad e intensidad de la activación del macrófago dependía de la naturaleza de las señales generadas por el inductor y de la

citoquina moduladora (Stout y Suttles, 2004). Se sugirió que el predominio de células Th1 (productoras de INF- γ e IL-2) o Th2 (productoras de IL-4, IL-5 e IL-10), podría favorecer un tipo de activación y la generación de subpoblaciones de macrófagos definidas (Rutherford y cols., 1993; Stout, 1993; Stout y Suttles, 1997 y 2004).

Sin embargo, el énfasis sobre las funciones inflamatorias y citotóxicas de los macrófagos activados mantuvieron la percepción de que sólo citoquinas Th1, como INF- γ y TNF- α , promovían la activación del macrófago, mientras que las Th2, como IL-4 o IL-10, bloqueaban o revertían su inducción, un fenómeno denominado desactivación, requerido para limitar las respuestas inflamatorias durante la reparación del tejido (Stout y Suttles., 2004; Bogdan y cols., 1991 y 1992). La IL-10 inhibe la producción por parte de macrófagos activados de IL-6 y de la liberación de productos derivados del oxígeno, por lo tanto, la capacidad de éstos de estimular la síntesis de citoquinas por parte de las células Th1 (Fiorentino y cols., 1991; Bogdan y cols., 1991). Por otro lado, el TNF- α y los productos derivados del oxígeno eran antagonizados por IL-4, IL-10 y TGF- β (Ding y cols., 1990; Nelson y cols., 1991; Tsunawaki y cols., 1988), por ello estas últimas citoquinas fueron denominadas desactivadoras del macrófago.

Sin embargo, observaciones posteriores demostraron que la IL-4 inducía la expresión de algunas moléculas MHC-II en monocitos de humanos (Becker y Daniel, 1990; Gerrard y cols., 1990) y del antígeno Ia de superficie en macrófagos peritoneales murinos (Cao y cols., 1989; Crawford y cols., 1987), el cual es requerido para que una célula pueda interactuar con las células Th.

El macrófago, siendo una de las células más ubicuas y capaz de interaccionar con muchas proteínas, está considerado como la principal CPA que participa en el reclutamiento de linfocitos T. Los linfocitos B tienen una mayor dificultad de internalizar partículas de gran tamaño pero, en estas circunstancias, las células B podrían interactuar con las proteínas solubilizadas liberadas por los macrófagos (Unanue, 1984).

El inicio de una respuesta inmunitaria depende de la expresión de MHC-II en las membranas de las CPAs. Se ha demostrado que macrófagos peritoneales de ratones expuestos a IFN- γ o IL-4 muestran de manera más significativa el MHC-II que células control no tratadas (Cao y cols., 1989). Ulteriormente, se reportó la inducción de expresión y actividad del receptor de la manosa o CD206 en macrófagos peritoneales con IL-4, regulada negativamente por el IFN- γ , lo que llevó a proponer que la IL-4 no era propiamente desactivadora, sino que estimulaba la expresión de un “fenotipo alternativo”, diferente al de los macrófagos activados con IFN- γ y LPS (Stein y cols., 1992).

Se evidenció que el pretratamiento con IL-4 incrementaba la producción de IL-12 y TNF- α en células mononucleares de sangre periférica en respuesta a LPS o *Staphylococcus aureus* (D'Andrea y cols., 1995) y que podía regular positivamente quimiocinas o enzimas intracelulares, como es el caso de la arginasa, estableciendo un patrón funcional diferente al inducido por IFN- γ (Gordon, 2003).

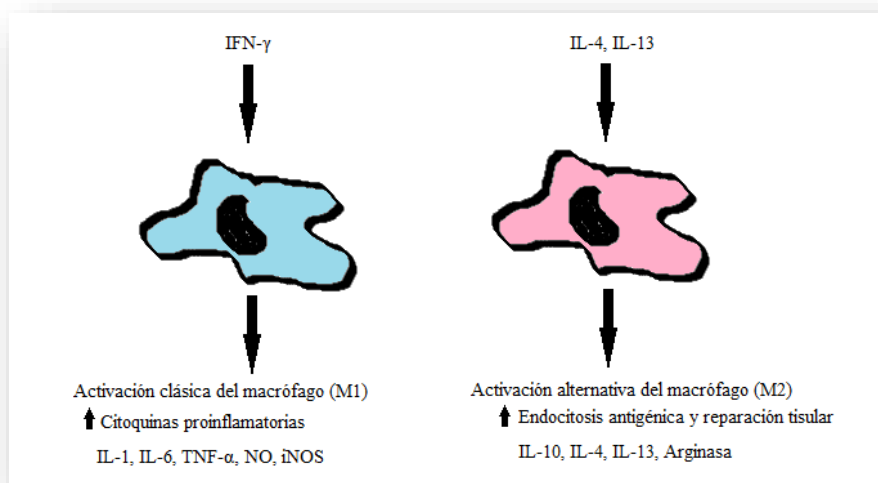


Figura 5. Esquema en el que se ilustran las diferentes formas de activación de los macrófagos y las citoquinas y relacionadas con cada una de ellas.

Los macrófagos son capaces de producir óxido nítrico (NO) luego de la estimulación con productos microbianos o con citoquinas. Sin embargo, los macrófagos M2 fallan en producir NO en virtud de la inducción de la enzima arginasa en lugar de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) para el metabolismo del nitrógeno y consecuentemente tienen disminuida su capacidad para matar patógenos intracelulares.

Hasta el momento, no se ha consolidado una definición clara de activación alternativa debido a que se ha observado que los efectos de IL-4 en la generación de un fenotipo de macrófago activado alternativamente se solapan de manera parcial con los inducidos por IL-13, IL-10, glucocorticoides y TGF- β , por lo que algunos autores los consideran como activadores alternativos (Goerdt y cols., 1999; Mantovani y cols., 2002; Mosser, 2003; Katakura y cols., 2004; Mantovani y cols., 2004).

Se propuso el uso de M2 como nombre genérico para las formas alternativas de activación que, además, comparten propiedades funcionales generalmente involucradas en respuestas tipo Th2, como inmunorregulación y remodelación de tejido (Mantovani y cols., 2004).

2.5.1. Papel de los macrófagos M2 en infecciones por helmintos.

Los macrófagos son una población celular que desempeña importantes funciones dentro del sistema inmunitario. Tienen funciones homeostáticas que incluyen reparación, modelación y angiogénesis de los tejidos y proveen protección al poner en marcha mecanismos inmunitarios innatos e iniciar el desarrollo de respuestas inmunitarias específicas a través del procesamiento y presentación de antígenos, la expresión de moléculas co-estimulatorias y la producción de citoquinas (Turpin y cols., 1993).

Los macrófagos M2 se observan en una amplia variedad de infecciones por helmintos, donde también se incluyen respuestas de tipo Th2, como es el caso de infecciones por *Schistosoma mansoni* (Herbert y cols., 2004), *Heligmosomoides polygyrus* (Anthony y cols., 2006), *Nippostrongylus brasiliensis* (Reece y cols., 2006), *Taenia crassiceps* (Rodríguez-Sosa y cols., 2002), *Trichinella spiralis* (Dzik y cols., 2004),

Fasciola hepatica (Donnelly y cols., 2005), *Ascaris suum* (Oshiro y cols., 2005) y parásitos filariales (Nair y cols., 2003).

Los macrófagos alternativamente activados (M2) presentan varias funciones durante las infecciones por helmintos:

- 1) Regulación de la respuesta inmunitaria: Diversos estudios han sugerido que los macrófagos M2 favorecen la diferenciación de respuestas inmunitarias Th2 (Hayashi y cols., 1999; Mantovani y cols., 2002). Sin embargo, descubrimientos más recientes *in vivo* indican que, en el contexto de infecciones por helmintos, los macrófagos M2 no son esenciales para el desarrollo de las respuestas Th2 (Herbert y cols., 2004; Anthony y cols., 2006; Taylor y cols., 2006). Aunque las infecciones por helmintos varían mucho en términos de la interacción que provocan entre las respuestas Th1 y Th2, parece ser que los macrófagos M2 están implicados en el bloqueo de una respuesta inflamatoria de tipo Th1 más que en la inducción de la respuesta Th2 y de las células implicadas en esta última. El mecanismo de acción de estos macrófagos no está aún esclarecido, sin embargo, parecer ser que actúa de forma IL-10 independiente (Herbert y cols., 2004; Terrazas y cols., 2005; Taylor y cols., 2006).
- 2) Reparación tisular: Los helmintos causan daño al migrar a través del tejido, liberando a su vez enzimas proteolíticas y se ha estudiado que los macrófagos M2 contribuyen con los fenómenos de fibrosis y de reparación tisular en heridas (Martin y Leibovich, 2005). Se ha descrito la presencia de extensos granulomas, eosinofilia y sobreexpresión de genes involucrados en la remodelación tisular en

la schistosomiasis en modelo murino (Sandler y cols., 2003). Estos fenómenos de formación de granulomas y de infiltración eosinofílica también se produce a nivel del hígado en la infección por *F. hepatica* (Dow y cols., 1968).

- 3) Eliminación de parásitos y resistencia: Los macrófagos M2 pueden liberar ciertos componentes que inducen a una respuesta Th2, importante en la eliminación del parásito. En el ejemplo de la infección por *N. brasiliensis*, tiene lugar el reclutamiento de eosinófilos al pulmón y peritoneo del hospedador (Voehringer y cols., 2007). La quitina es un componente no proteico que poseen algunos helmintos y se ha demostrado que media la activación M2 de macrófagos *in vivo*, además de la producción de leucotrieno B4, el cual es requerido para promover un óptimo reclutamiento de células inmunitarias (Reese y cols., 2007). En reinfecciones con el nematodo *H. polygyrus* se ha descrito la eliminación del parásito previa infiltración en el lugar de invasión de neutrófilos y macrófagos M2 alrededor del parásito, formando un granuloma Th2 y una banda de células T CD4⁺ y de células dendríticas CD11c⁺ alrededor de los macrófagos (Gause y cols., 2003).

2.5.2. Activación clásica (M1) y alternativa (M2) del macrófago y papel en la infección por *F. hepatica*.

F. hepatica posee un factor de crecimiento (FhTLM), el cual pertenece a la familia de TGF (Rodríguez y cols., 2015) y puede desempeñar efectos de desarrollo en el parásito. El FhTLM puede unirse con gran afinidad a TGF- β y esto se traduce en el inicio de una serie de acontecimientos que producen cambios tanto en fibroblastos como en macrófagos. Cuando los PBMCs se estimulan con FhTLM, éstos adoptan un perfil fenotípico alternativo o regulador, expresando niveles altos de IL-10, arginasa-1 y mostrando niveles bajos de IL-12 y NO. Además, también producen la activación del receptor de manosa. El FhTLM también ayuda a los NEJs en su invasión del hospedador, reduciendo los niveles de NO en los macrófagos (Sulaiman y cols., 2016).

Además, la interacción de estos FhESP con las células del sistema inmunitario innato, como son los macrófagos, es crucial en estadios tempranos de la infección. En un estudio llevado a cabo por Guasconi y colaboradores (2011), los macrófagos peritoneales de ratones estimulados *in vitro* con FhESP presentaron un incremento en la actividad y expresión de la arginasa y altos niveles de producción de TGF- β y de IL-10. Una inhibición parcial de los efectos inmunomoduladores se observó cuando los macrófagos fueron incubados con un receptor anti-mansosa. Estos resultados sugieren que el parásito induce efectos inmunorreguladores sobre los macrófagos y puede constituir un evento fundamental en la extensión de la supervivencia del parásito en el hospedador.

Experimentos con animales de laboratorio han demostrado el reclutamiento y activación de macrófagos M2 tiene lugar en las 24h después

de la infección con *F. hepatica* (Donnelly y cols., 2005, 2008; Adams y cols., 2014). Este efecto de inmunomodulación temprana probablemente juega un papel crítico para determinar el resultado final de la infección por *F. hepatica* y se desencadena directamente por moléculas (como proteasas inhibidoras de proteasas y antioxidantes) secretadas por el parásito y por moléculas del hospedador (alarminas) que marcan el tejido dañado para estimular los mecanismos de reparación inmune (Dalton y cols., 2013).

Las proteínas del FhTeg junto con los FhESP, inducen una polarización de los macrófagos hacia un fenotipo de activación alternativa o M2. Este fenotipo es responsable de mecanismos de reparación tisular por parte del hospedador, fibrosis tisular y modulación de la inmunidad adaptativa, lo cual suprime una respuesta Th1 inflamatoria y protectora en la infección por *F. hepatica* (Flynn y cols., 2007; Adams y cols., 2014; Figueroa-Santiago y cols., 2014).

2.6. APLICACIÓN DE LAS TECNOLOGÍAS “ÓMICAS” EN LA INFECCIÓN POR *F. hepatica*.

2.6.1. Introducción.

Gracias a las tecnologías *ómicas* emergentes se están realizando grandes avances respecto al entendimiento de la biología de *F. hepatica*, sobre todo en lo relativo a las moléculas que participan en la interacción hospedador-parásito. La investigación de estas moléculas, que son esenciales en la infección, virulencia y supervivencia a largo plazo del parásito en el hospedador definitivo, es un objetivo potencial para el descubrimiento de medidas eficaces en el control de la enfermedad.

Las tecnologías de secuenciación de ácido desoxirribonucleico (ADN) han evolucionado de manera rápida durante las últimas décadas, comenzando por la metodología tradicional de Sanger usada para obtener el primer genoma humano (Lander y cols., 2001; Venter y cols., 2001) a la reciente metodología de secuenciación de alto rendimiento como son Roche 454 e Illumina (Reuter y cols., 2015) que se utilizan hoy en día. Junto con estos avances en tecnología, también hay que destacar la mejora en los protocolos de rutina para la extracción de ácidos nucleicos (Price y cols., 2009). Todo esto hace que actualmente sean muchos los proyectos basados en la secuenciación, entre los cuales se encuentra la ambiciosa propuesta de secuenciar el genoma de 10.000 vertebrados (Genome 10KProject; Koepfli y cols., 2015), 5.000 artrópodos (i5K project; Poelchau y cols., 2015) y todas las 10.500 especies de pájaros (B10K project; Jarvis, 2016).

En el área de la parasitología, se inició una colaboración a gran escala para secuenciar 50 genomas de helmintos de importancia global tanto en medicina humana como en veterinaria (50 Helminth Genomes Project,

50HGP; <http://www.sanger.ac.uk/science/collaboration/50hgp>). Gracias a los avances en secuenciación, se superó el número de genomas secuenciados bajo esta directiva, de manera que actualmente la base de datos que almacena estos genomas, denominada WormBase ParaSite, comprende 134 genomas, representando a 114 especies (Howe y cols., 2017). Además de ser una base de datos que actúa como repositorio central de acceso público para la comunidad investigadora, WormBase ParaSite integra todos los datos disponibles de genómica y transcriptómica para facilitar la comparación de análisis genómicos.

El hecho de determinar el repertorio de transcripciones expresadas por un organismo en una fase particular de su desarrollo, del estadio de infección o en respuesta a señales externas, ha evolucionado también con los avances en tecnología de secuenciación. Los estudios se centraron primero en analizar secuencias parciales, conocidas como marcadores de secuencia expresada (ESTs/*expressed sequence tags*), las cuales son pequeñas subsecuencias de una secuencia nucleotídica transcrita (codificante de una proteína o no) (Parkinson and Blaxter, 2009). Todo esto en conjunto con el análisis en serie de la expresión génica (SAGE/*serial analysis of gene expression*), la cual es una técnica de Biología Molecular que permite conocer y cuantificar la expresión de los genes en la célula mediante la medición de los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) que están presentes en ésta en un momento determinado, han facilitado los estudios de expresión génica, así como la detección y el análisis de transcripciones poco abundantes (Sun y cols., 2004).

Sin embargo, fue el desarrollo de chips de ADN (DNA microarrays) de expresión génica los que iniciaron el análisis de alto rendimiento del

transcriptoma y el que todavía se utiliza en la actualidad. Sin embargo, debido a que los microarrays sólo detectan genes conocidos inmovilizados en los microchips, son menos efectivos para el descubrimiento de genes nuevos. Por el contrario, la secuenciación de ARN (RNAseq/sequencing) permite el análisis de todas las transcripciones de genes presentes en una muestra determinada por lo que, actualmente, ha reemplazado en gran medida a los microarrays.

Toda esta nueva gama emergente de herramientas de secuenciación de perfiles transcriptómicos también se ha aplicado a los parásitos helmintos. Concretamente, se han generado aproximadamente 508000 ESTs de parásitos platelmintos y están almacenados en la base de datos de NCBI: dbEST (<https://222.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>). La metodología SAGE también se ha empleado para el análisis de la expresión génica en diferentes estadios de ciclos biológicos (Knox y Skuce, 2005) como el caso del análisis de los genes expresados por *S. mansoni* durante el desarrollo en el hospedador mamífero y durante la fase larvaria en el hospedador intermediario (Williams y cols., 2007; Taft y cols., 2009). Más recientemente, se han completado análisis de RNAseq a gran escala para una gran variedad de parásitos platelmintos, algunos de los cuales han sido publicados en la página web llamada Helminth.net (Martin y cols., 2015).

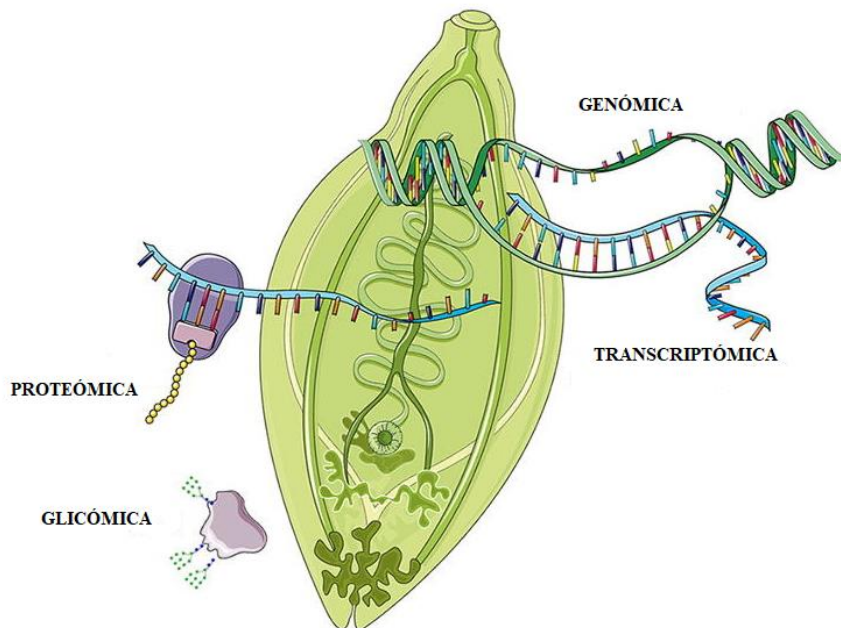
Paralelamente, los avances en tecnología de análisis de proteómica, permiten la identificación y caracterización de proteínas complejas (Yarmush y Jayaraman, 2002; Brewis y Brennan, 2010). También ha tenido lugar un avance en los protocolos de extracción de proteínas, tanto solubles como las que están unidas a membrana, y un aumento en la sensibilidad de los análisis de proteómica, incluyendo técnicas que no necesitan geles y que

basta con pequeñas cantidades de proteínas (microgramos) para poder realizarlas (Scherp y cols., 2011). Gracias a la integración de los datos de proteómica junto con los de genómica y transcriptómica, el conjunto de datos obtenidos puede ser más preciso y proporcionar información tanto cualitativa como cuantitativa sobre la expresión de genes y sus productos, así como datos relacionados con la existencia de variantes procedentes del empalme del ARN o con modificaciones post-translacionales.

Como se ha detallado anteriormente, la interacción hospedador-parásito es un fenómeno complejo en el que están involucradas moléculas producidas por ambas partes. En el caso de *F. hepatica*, los FhESP han sido investigados en numerosos estudios utilizando herramientas de proteómica y los resultados han proporcionado una valiosa fuente de inmunomoduladores, agentes diagnósticos y candidatos vacunales que pueden ser escogidos a voluntad para investigar con ellos y avanzar en la comercialización de bioterapéuticos (Cwiklinski y Dalton, 2018).

El acceso a las bases de datos de genómica, transcriptómica y proteómica proporciona una gran fuente de información acerca del parásito helminto *F. hepatica* y nos permite indagar en el conocimiento de su biología y de su capacidad para invadir y establecerse en el hospedador. Actualmente, la colección de bases de datos de estas características para *F. hepatica* es bastante amplia e incluye un proyecto de genoma, transcriptomas específicos de cada etapa de su ciclo y conjuntos de datos proteómicos del proteoma somático, el secretoma, vesículas extracelulares y el glicoproteoma de su tegumento externo.

ANÁLISIS MEDIANTE TECNOLOGÍA "ÓMICA" DE *FASCIOLA HEPATICA*



Fuente de la imagen: Les Laboratories Servier
<https://smart.servier.com/>

2.6.2. Aplicación de la tecnología genómica en la infección por *F. hepatica*.

F. hepatica posee el genoma nuclear más amplio que se ha descubierto hasta la fecha dentro de la clase trematoda (Cwiklinski y cols., 2015). La razón de esto no ha sido aún determinada, pero análisis comparativos han descubierto que el incremento en el tamaño del genoma tiene que ver con incrementos en la media de la longitud de los intrones y de los exones, aunque esto por sí solo no explicaría por completo el amplio genoma de *F. hepatica*. Se necesitan realizar análisis más específicos sobre regiones no codificantes para determinar su función y, en particular, su importancia en la regulación génica (ENCODE Project Consortium 2012).

2.6.3. Aplicación de la tecnología transcriptómica en la infección por *F. hepatica*.

Para el desarrollo de nuevas estrategias de control y de vacunas contra *F. hepatica* se requiere un conocimiento específico del ciclo biológico de este parásito. Para ello, el conocimiento de los genes que son transcritos en cada etapa del desarrollo de éste, así como su abundancia, es crucial para alcanzar estos objetivos.

Los estudios iniciales en la identificación de genes se basaron en un número limitado de ESTs generados tomando parásitos adultos de *F. hepatica*, siendo esta base de datos de ESTs una fuente esencial para identificar secuencias peptídicas y poder realizar estudios de proteómica en este parásito (Chemale y cols., 2006; Robinson y cols., 2009; Chemale y cols., 2010; Haçariz y cols., 2014; Morpew y cols., 2014).

Robinson y colaboradores, (2009) realizaron un estudio en el que integraron técnicas de transcriptómica y proteómica basado en las ESTs de

F. hepatica adulta para determinar la expresión de las proteínas secretadas en el curso de migración de este parásito en el hospedador. Sin embargo, este análisis se basó en la premisa de que podrían establecerse similitudes entre las proteínas expresadas por los parásitos adultos que residen en los conductos biliares y las expresadas por los parásitos migrantes (NEJs). La utilización de una base de datos específica para adultos con un número limitado de secuencias puede dar lugar a la omisión en la identificación de proteínas específicas de los NEJs.

Cancela y colaboradores (2010), descubrieron algunas secuencias de *F. hepatica* que no habían sido previamente descritas, siendo éstas específicas de NEJs. En concreto, se caracterizaron por ser varias proteasas del grupo catepsina y enzimas antioxidantes, de manera que mostraron que *F. hepatica* tiene proteasas y enzimas específicas que puede utilizar a lo largo de su ciclo biológico. La identificación de genes específicos en esta etapa del ciclo biológico del parásito resaltó la necesidad de hacer análisis más extensos basados en cada estadio del parásito.

La secuenciación de varias de las etapas del desarrollo temprano de *F. hepatica*, como son la forma infectiva de la metacercaria y los NEJs de 1, 3 y 24 horas después del desenquistamiento, así como las formas juveniles de 21 días y el de los parásitos adultos, se han determinado gracias al desarrollo de la tecnología de secuenciación Illumina y se ha obtenido así el perfil transcripcional de *F. hepatica* durante la infección (Cwiklinski y cols., 2015). Los análisis mostraron que el parásito es capaz de regular la transcripción de muchos de sus genes, siendo esta transcripción progresivamente más elevada e interviniendo más cantidad de genes a

medida que el parásito crece y se desarrolla en su preparación para la migración a través del hígado del hospedador (Cwiklinski y cols., 2015).

2.6.4. Aplicación de la tecnología proteómica en la infección por *F. hepatica*.

Los estudios de proteómica relacionados con *F. hepatica* están teniendo una expansión reciente, ya que no sólo se analizan las subclases de proteínas, como las catepsinas (Dalton y cols., 2003) y glutatión S-transferasas, (Hillyer., 2005; Chemale y cols., 2006), sino que también se están desarrollando estudios más avanzados para la identificación de proteínas como las contenidas en los FhESP del parásito *in vitro* (Jefferies y cols., 2001) y una comparación entre los detectados *in vitro* y en el conducto biliar de oveja infectada mediante electroforesis en gel de 2 dimensiones (2D) (Morphew y cols., 2007).

Los primeros estudios de proteínas utilizaban etiquetado radio-metabólico (*radio-metabolic labelling*) para determinar proteínas de varios estadios del ciclo de desarrollo de *F. hepatica* (Irving y Howell, 1982; Dalton y cols., 1985). También se llevaron a cabo diversas técnicas de isoelectroenfoque y de densitometría para caracterizar los FhESP en un amplio rango de hospedadores mamíferos (llamas, ratas, ratones y bovinos) y mostraron un patrón de bandas diferente (Lee y cols 1992a; 1992b). Este análisis fue mejorado gracias a los trabajos de Jefferies y colaboradores (2000, 2001) por medio de la utilización de electroforesis en gel 2D y la subsecuente caracterización de proteínas, de manera que se identificaron un rango de proteasas del grupo de las catepsinas L, superóxido dismutasa, peroxirredoxina, glutatión S-transferasa y proteínas de unión a ácidos grasos.

En contraste con la gran cantidad de proteínas secretadas por el adulto de *F. hepatica*, el análisis de los estadios de desarrollo temprano de *F. hepatica* se torna complicado dado el pequeño tamaño de este y la dificultad de localizarlo en los tejidos del hospedador. La investigación a nivel molecular de los huevos de *F. hepatica* determinó que poseen 28 proteínas en el proteoma somático y que la complejidad de estas proteínas iba en aumento con la maduración de estos huevos, la cual se relaciona con el desarrollo del estadio del miracidio (Moxon y cols., 2010). Este estudio demostró que el perfil proteico de los huevos de fasciola difiere de otros estadios de desarrollo.

El desarrollo de herramientas de análisis de proteómica y la facilidad de acceso a los parásitos de *F. hepatica* han contribuido a la expansión de bases de datos del proteoma de los NEJs en su estadio migratorio. Se identificó un alto nivel de complejidad proteica en el secretoma de parásitos a los 21 dpi (45 proteínas) en comparación con el de NEJs a las 24 horas post-desenquistamiento (29 proteínas) y el secretoma de fasciola adulta (22 proteínas), con un amplio rango de catepsinas y de enzimas antioxidantes secretadas (Robinson y cols., 2009). Estos resultados son consistentes con los trayectos de migración y de alimentación en estos estadios, además de haberse descrito un aumento en la transcripción de genes en esta fase (Andrews, 1999; Cwiklinski y cols., 2015).

Di Maggio y colaboradores (2016), realizaron un estudio sobre las proteínas secretadas por la Fasciola adulta y por NEJs a las 48 horas post-desenquistamiento y lo compararon con el proteoma somático de los NEJs a las 48h. Siendo consistente con otros análisis de secretoma, un rango de proteasas e inhibidores de proteasas fueron detectados en ambos estadios,

representando más del 70% y menos del 10% del total de proteínas secretadas, respectivamente. Además, proteínas que no habían sido descritas anteriormente fueron identificadas en el proteoma somático de los NEJs, incluyendo proteínas estructurales y proteínas relacionadas con el metabolismo, expandiendo nuestro conocimiento sobre este estadio del desarrollo de *F. hepatica*.

Las formas adultas de *F. hepatica* residen en los conductos biliares y se encuentran inmersos en bilis, la cual se compone principalmente por ácidos biliares, fosfolípidos, colesterol, bilirrubina y sales inorgánicas (Farina y cols., 2009). Los análisis proteómicos del secretoma de la fasciola adulta localizada en los conductos biliares del hígado (cuando está a salvo de la acción del sistema inmune del hospedador) de ovejas infectadas por *F. hepatica* muestran que la mayoría están formadas por proteasas de tipo catepsina L (Andrews, 1999; Correia y cols., 2001; Morphew y cols., 2007).

La caracterización proteómica del FhTeg ha determinado que principalmente está compuesto por proteínas estructurales, proteínas transportadoras, proteínas involucradas en mecanismos de secreción y enzimas antioxidantes (Wilson y cols., 2011; Haçariz y cols., 2012). Una variedad similar de proteínas se identificó en el proteoma somático del tegumento externo de los NEJs (Hernández-González y cols., 2010).

2.7. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y TRANSCRIPTÓMICO DE LAS RESPUESTAS DEL HOSPEDADOR FRENTE A LA INFECCIÓN POR *F. hepatica*.

Las investigaciones en las respuestas del hospedador frente a la infección por *F. hepatica* nos han proporcionado una vista global acerca de los efectos de la fasciolosis a nivel inmunológico y nos han revelado posibles aspectos novedales de la patogénesis asociados a la infección. Todo esto con el fin de evaluar y seleccionar candidatos vacunales potencialmente eficaces, identificando los genes involucrados en conferir protección (Wesołowska y cols., 2013; Rojas-Caraballo y cols., 2017).

En el trabajo llevado a cabo por Álvarez Rojas y colaboradores (2015), se descubrió que a las 8 spi los genes que se correspondían con los procesos de fibrosis y de reparación del tejido aparecían sobreexpresados en ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica*. Este hecho es consistente con la subsecuente regeneración de tejido que se produce tras la migración invasiva del parásito en el parénquima hepático. Además, en este mismo trabajo se describe una sobreexpresión de los genes relacionados con la diferenciación Th2 y con la activación de linfocitos B, mientras que los asociados con la respuesta Th1 estaban suprimidos.

La transcripción de genes durante la infección por *F. hepatica* en oveja está muy regulada, particularmente durante la infección aguda (1-2 spi) y tiene lugar un aumento de la expresión de genes asociados con la señalización de TGF- β , los cuales juegan un papel muy importante en el proceso de fibrosis, resultados que han sido también observados en el

análisis transcriptómico de los hígados descrito anteriormente (Álvarez Rojas y cols., 2015).

Resultando consistente con la polarización de la respuesta inmunitaria hacia una de tipo Th2, así como de los macrófagos hacia un fenotipo M2, el gen que codifica para la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) mostró una disminución de la regulación en respuesta a la infección con *F. hepatica* tanto en los estados agudos como crónicos de la infección (Fu y cols., 2016). En contraste con este estudio, sin embargo, los genes que codifican interleuquinas, en particular los relacionados con las respuestas de tipo Th2, como la IL-4, no expresaron diferencias estadísticamente significativas en el trabajo realizado por Álvarez Rojas y colaboradores (2016).

También se han utilizado herramientas de proteómica para identificar biomarcadores de infección a nivel sistémico en el suero. Rioux y colaboradores (2008), mostraron que hubo cambios significativos en el suero y que estos comenzaron en la 3^a spi, resultados consistentes con el análisis transcriptómico de PBMCs que resaltaba un mayor nivel de expresión génica durante la infección aguda (Fu y cols., 2016; Álvarez Rojas y cols., 2016). Estos resultados también coinciden con la marcada expresión de más de 8000 genes que acompañan al rápido crecimiento y desarrollo de *F. hepatica* en las primeras tres semanas de infección (Cwiklinski y cols., 2015).

Se han identificado dos marcadores de especial interés: la transferrina y la apolipoproteína A-IV (Apo A-IV), que muestran sobreexpresión durante este periodo (Rioux y cols., 2008). La transferrina está asociada con la anemia causada por los parásitos que se

alimentan de sangre, mientras que la Apo A-IV está asociada con la regulación del apetito a nivel del intestino en mamíferos (aunque estudios en rata y ratones insinúan un posible papel en el hígado (VerHague y cols., 2013). Los niveles de transferrina detectados en la bilis por Morphew y colaboradores (2007), fueron menores en comparación con los niveles detectados en el suero. Esto pone en relieve que los datos pueden variar significativamente según el tipo de muestra analizada (suero, bilis, líquido peritoneal, etc.) así como el momento de la infección.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Con el fin de evaluar la presencia y cuantificación de las células inmunocompetentes y su expresión de citoquinas, así como el análisis proteómico, en el líquido peritoneal de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica* en los estadios tempranos, se realizaron dos experimentos, a los que se hará referencia como **experimento o experiencia 1** y **experimento o experiencia 2**.

Tanto los análisis de niveles de anticuerpos en el líquido peritoneal (Apartado 3.4. de Material y Métodos) como la determinación de la expresión génica de citoquinas en leucocitos peritoneales (Apartado 3.5. de Material y Métodos) y el análisis proteómico del líquido peritoneal ovino mediante espectrofotometría de masas (Apartado 3.6. de Material y Métodos), se llevaron a cabo con muestras de líquido peritoneal de animales infectados 18 dpi y animales del grupo control no infectado del **experimento 1**. Dado que estos análisis se realizaron en Queen's University (Belfast, UK) y debido a factores tanto económicos como de limitación en el tiempo, se decidió utilizar sólo los animales pertenecientes al grupo 18 dpi y grupo control no infectado para llevar a cabo estos análisis.

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

En cada uno de los dos experimentos (**experimento 1** y **experimento 2**) que se llevaron a cabo en este estudio, se utilizaron 25 ovejas de 8 meses de edad de raza Merina y obtenidas de una granja libre de *F. hepatica*. En el **experimento 1** se utilizaron ovejas hembra; sin embargo, en el **experimento 2** se utilizaron ovejas macho para evitar el sangrado causado por la mayor vascularización que poseen las hembras en la zona ventral del abdomen durante el procedimiento de extracción del líquido peritoneal. Los animales se compraron con un mes de edad y se estabularon en la granja

experimental de Rabanales de la Universidad de Córdoba hasta que alcanzaron la edad apropiada para realizar la infección experimental. Antes de realizar este ensayo, todos los animales fueron mensualmente testeados para el control de la presencia de huevos de parásitos en las heces mediante sedimentación, dando resultados negativos en todos los casos y, además, el suero de estos animales se analizó para determinar la posible presencia de IgG específica frente a la catepsina L1 de *F. hepatica* (FhCL1) mediante el método ELISA, obteniendo también en resultados negativos en todos los casos. Las ovejas se distribuyeron en 5 grupos (n=5), de los cuales 4 se infectaron y se eutanasiaron en diferentes fases tempranas de la infección, a los 1, 3, 9 y 18 días post-infección (dpi). El quinto grupo de animales no se infectó y se utilizó como control negativo de la infección. Las ovejas que estuvieron sujetas a la infección experimental, recibieron una dosis vía oral de 150 metacercarias de la cepa de *F. hepatica* South Gloucester (Ridgeway Research Ltd, UK), para lo cual se utilizaron cápsulas de gelatina y una pistola de administración de bolos ruminales, y fueron eutanasiadas vía intravenosa con un agente eutanásico inyectable compuesto principalmente por embutramida, yoduro de mebezonio y clorhidrato de tetracaina (T61®, Intervet, España). Estos experimentos obtuvieron la aprobación por parte del Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba (Nº 1118) y se llevaron a cabo de acuerdo a las directivas europea (2010/63/UE) y española (RD 1201/2005) sobre experimentación animal.

3.2. TOMA DE MUESTRAS.

3.2.1. Toma de sangre, obtención de suero y análisis de enzimas hepáticas.

El estudio del análisis de las enzimas hepáticas sólo se realizó en el **experimento 2**. Para ello, se procedió a la punción de la vena yugular utilizando tubos Vacutainer® (Becton, Dickinson and Co., NJ, EEUU) con heparina sódica como anticoagulante. Posteriormente, se centrifugaron a 500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante, conteniendo el suero, se recogió y fraccionó en alícuotas que se almacenaron a –20°C. Estas alícuotas de suero se remitieron al laboratorio de análisis clínicos dentro del “Agri-Food and Biosciences Institute” (AFBI), Belfast, Reino Unido, donde se realizaron los análisis pertinentes para la obtención de los resultados de los niveles de enzimas hepáticas en suero.

3.2.2. Recogida y procesado de líquido peritoneal.

Tanto en el **experimento 1** como en el **2**, los lavados peritoneales se realizaron inmediatamente después de que los animales fueran eutanasiados. En primer lugar, la zona ventral del abdomen se rasuró y se desinfectó con povidona yodada al 10% (AGB, Madrid, Spain). A continuación, se realizó una incisión de 2 cm en la piel, a nivel de la línea alba, diseccionándose el tejido subcutáneo con tijeras de punta roma para evitar el sangrado. En la **experimento 1**, se utilizó una mezcla consistente en 60 ml de tampón fosfato salino destilado y estéril (DPBS/*Dulbecco's Phosphate-Buffered saline*) y 9500 UI de heparina (Rovi, Madrid, España) precalentado a 37°C. Sin embargo, en la **experimento 2**, se utilizó una mezcla compuesta por 60 ml de DPBS y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA/*ethylenediaminetetraacetic acid*) como anticoagulante. En cualquier caso, esta mezcla se introdujo en una jeringuilla y se conectó a una cánula de 40 cm de longitud, la cual se introdujo por la abertura realizada previamente y se inyectó de manera paulatina en la cavidad abdominal de la oveja. Después, se realizó un suave masaje externo de la zona abdominal durante un minuto para favorecer la mezcla del líquido inyectado con el propio fluido peritoneal del animal, y con la misma jeringuilla y cánula, se aspiró para obtener el líquido peritoneal y se dispensó en nuevos tubos Falcon.

3.2.2.1. Determinación y recuento del número total de leucocitos en el líquido peritoneal.

Para realizar el recuento de las células peritoneales totales viables, se llevó a cabo la técnica de tinción con tripán azul y cámara de Neubauer. Se empleó una dilución 1:10 de líquido peritoneal y tripán azul, se tomaron 10 µl de esta solución con una pipeta y se depositaron en el espacio entre la cámara de Neubauer y un cubre limpio, entrando la mezcla por capilaridad. Utilizando el objetivo de 4x de un microscopio óptico, se enfocó la retícula central de la cámara de Neubauer, la cual consta de un cuadrado primario que contiene 9 cuadrados secundarios, cada uno de ellos dividido a su vez en 16 cuadrados terciarios. Los cuadrados que debemos tener en cuenta para el recuento leucocitario son los 4 secundarios presentes cada uno en una esquina del cuadrado primario. Para ello, deberemos cambiar al objetivo de 10x y, con la ayuda de un contador manual, contar las células refringentes que se encuentran dentro de los 16 cuadrados terciarios que hay dentro de estos 4 cuadrados secundarios. Se incluirán las células que estén en el límite con los bordes superior e izquierdo de cada cuadrado secundario. Dividir el número total de células contadas entre 4 (4 cuadrados secundarios) para obtener la media. Debido a que el volumen de un cuadrado secundario es: $0,1 \times 0,1 = 0,01 \text{ cm}^2$ y la profundidad de la cámara es 0,01 cm:

$$0,01 \text{ cm}^2 \times 0,01 = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ ml}$$

Ya que teníamos una dilución del líquido peritoneal en tripán azul de 1:10:

$$0,0001 \text{ ml} \times 0,1 = 0,00001 = 10^5$$

La media de células contadas en los cuadrados secundarios de la cámara de Neubauer deberá ser multiplicada por $\times 10^5$ y obtendremos así el número de células por mililitro de líquido peritoneal.

3.2.2.2. Procesado del líquido peritoneal: sobrenadante y pellet.

El líquido peritoneal se centrifugó a 430 x g durante 5 minutos, separándose de esta forma el sobrenadante del pellet celular y procesándose ambas muestras por separado, como se detalla a continuación:

- Procesado del sobrenadante: El sobrenadante obtenido del líquido peritoneal fue dispensado en tubos Falcon de 15 ml y centrifugado a 1720 x g durante 10 minutos. El sobrenadante resultante de esta centrifugación se vertió a nuevos tubos Falcon de 15 ml y se sometió a una segunda centrifugación a 25000 x g durante 30 minutos. Finalmente, el sobrenadante obtenido se dispensó en nuevos tubos Falcon de 15 ml y se conservó a una temperatura de -80°C . Con estas muestras se realizó el análisis proteómico (Apartado 4.2. de Resultados) y de la respuesta inmunitaria de tipo humoral (Aparatdo 4.1.2. de Resultados).
- Procesado del pellet celular: El pellet fue primeramente incubado en tampón de eritrolisis (155 mM cloruro de amonio, 10 mM bicarbonato potásico y 0,1 mM EDTA) durante 10 minutos a temperatura ambiente con el objetivo de eliminar cualquier posible contaminación con eritrocitos. Después se centrifugó a 430 x g durante 5 minutos, el sobrenadante se decartó y el pellet se

resuspendió en 1 ml de DPBS. Con esta fracción del líquido peritoneal se realizaron los frotis de células peritoneales para realizar el conteo total y diferencial de las poblaciones celulares, así como, del estudio inmunocitoquímico (Apartado 4.1.1. de Resultados).

3.2.2.2.1. Concentración del líquido peritoneal, precipitación con ácido tricloroacético y análisis mediante electroforesis unidimensional en gel.

El sobrenadante congelado a -80°C (Apartado 3.2.2.2. de Material y Métodos), se descongeló durante 12 horas a 4°C. Una cantidad aproximada de 30 ml de sobrenadante por animal se dispensó de manera progresiva en unidades de filtro Amicon Ultra-15 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), el cual consta de una membrana que posee un límite de peso molecular nominal o tamaño de poro de 3000 Da y permite una recuperación de contenido proteico del 97,5%. Estas unidades conteniendo el sobrenadante fueron centrifugadas a 4000 x g durante 40 minutos y a una temperatura 4°C. El fluido concentrado resultante contenido por encima de la membrana fue tomado con una pipeta y dispensado en tubos eppendorf y centrifugado a 21000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante fue dispensado en criotubos (uno por animal). Finalmente, se tomaron 100 µl de cada criotubo de cada animal perteneciente a un mismo grupo (n=5) para constituir una mezcla o “pool” de cada grupo de 500 µl y se conservaron a -80°C.

Las proteínas contenidas en el fluido concentrado se sometieron a precipitación con ácido tricloroacético (TCA/*trichloroacetic acid*). Para ello, se tomaron 20 µl de cada pool de fluido concentrado y se le añadió el mismo volumen de TCA diluido al 20% en agua destilada. Esta mezcla se incubó durante 1 hora en hielo y, después, se centrifugó a 14000 x g durante 15 minutos y a 4°C. Tras la incubación, se formó un pellet de color blanco (proteínas) y se desechó el sobrenadante. Al pellet obtenido se le añadieron 50 µl de acetona e, inmediatamente después, se desechó esta acetona escurriendo el eppendorf boca abajo sobre papel de laboratorio.

Posteriormente, se resuspendió el pellet en 50 µl de SDS buffer y 3 µl de ditioneitol (DTT) y se calentó a 95°C durante 4 minutos.

Posteriormente, se procedió a la separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoelectrico mediante electroforesis en gel unidimensional (1-DE). Para la realización de este paso se utilizó un gel 4-12% SDS-PAGE (Criterion XT Bis-Tris, BioRad). Después de la electroforesis, el gel fue sometido a la acción de la enzima tripsina para la digestión de las proteínas presentes en éste. Los péptidos obtenidos de esta digestión proteica serán los que se someterán a análisis proteómico.

3.2.2.2.2. Realización de frotis con el pellet del líquido peritoneal.

Los frotis de líquido peritoneal se realizaron en portas que habían sido previamente tratados con Vectabond (Vector, CA, EEUU) con el pellet celular resuspendido en 1 ml de DPBS (Apartado 3.2.2.2. de Material y Métodos). Los frotis se realizaron manualmente de la siguiente manera (Figura 6): utilizando una pipeta, se toman 10 µl del pellet celular y se añade en forma de gota sobre un portaobjetos (Figura 6; 1) Con otro portaobjetos, se hace contacto con la gota y se dispersa por el filo de éste por capilaridad (Figura 6; 2). Se arrastra la gota de manera firme, desplazando el segundo portaobjetos formando un ángulo de 45° aproximadamente hasta que un área de un cuadrado del portaobjetos quede impregnado (Figura 6; 3). Los frotis, que se destinarán a realizar técnicas de inmunocitoquímica, se dejan secar a temperatura ambiente (TA) y se fijan en acetona durante 5 minutos. Después de dejarlos secar a TA, se conservan a -80°C.

Tras la realización de los frotis, el excedente del pellet celular se centrifugó a 22000 x g durante 20 minutos y, una vez descartado el sobrenadante, se conservaron los pellets celulares a -80°C para la extracción de ARNm y realización posterior de los análisis de expresión génica de citoquinas.

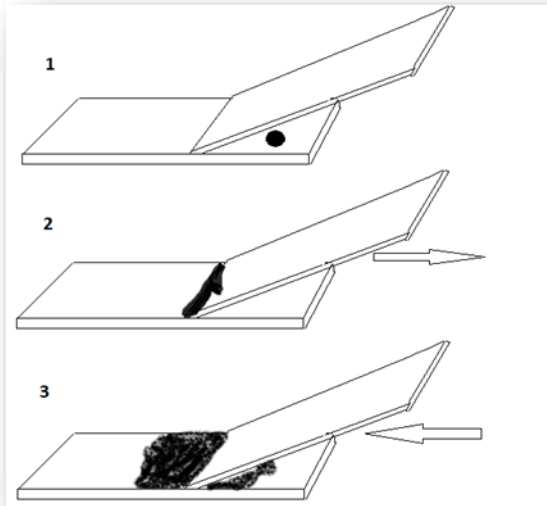


Figura 6: Esquema en el que se muestran los pasos para la realización de los frotis de líquido peritoneal.

3.2.3. Obtención y procesamiento de muestras de hígado fijadas en formol e inclusión en bloques de parafina.

Posteriormente a la recogida del líquido peritoneal de los animales, se procedió a realizar la necropsia reglada de los mismos. Se extrajo el hígado de cada animal y se realizaron dos fotografías de este, una por la cara visceral y otra por la cara diafragmática. Después, se tomaron muestras aleatorias de ambos lóbulos (3 del lóbulo izquierdo y 1 del lóbulo derecho) y se sumergieron en formol tamponado al 10% y se dejaron fijar durante 24 horas. Pasado este tiempo, las muestras se introdujeron en un procesador de tejidos para su deshidratación, pasando éstas por una serie descendente de alcoholes y xilol. Posteriormente, se incluyeron en bloques de parafina utilizándose un procesador automático de tejidos (CitadelTM, Thermo®, MA, EEUU) y una consola montadora de bloques (Histocentre 2TM, Thermo®, MA, EEUU). Una vez formado el bloque, se hicieron cortes seriados de 4 µm usando un microtomo (RM 2125RT, Leica Microsystems®, Alemania), se recogieron del baño histológico con portaobjetos previamente tratados con Vectabond y se secaron a 37°C. Los cortes se sometieron ulteriormente a tinción con hematoxilina-eosina (H-E) para la evaluación histopatológica del hígado y para la realización de la técnica de inmunohistoquímica en el **experimento 2**.

3.3. ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO EN LÍQUIDO PERITONEAL E INMUNOHISTOQUÍMICO EN HÍGADO.

3.3.1. Técnica inmunocitoquímica en frotis de líquido peritoneal en congelación para detección de anticuerpos anti-CD68, anti-CD14, anti-CD206, anti-iNOS, anti-CD83 y anti-MHC-II.

Los frotis de líquido peritoneal en congelación de los **experimentos 1 y 2** se sometieron a la técnica de inmunocitoquímica, que consistió en los siguientes pasos:

- 1) Los frotis del pellet celular del líquido peritoneal se sacaron del congelador (-80°C) y se dejaron atemperar y secar a TA. Se fijan en acetona durante 10 minutos y se dejan de nuevo secar a TA.
- 2) Inhibición de la peroxidasa endógena: 1 baño en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (Panreac, Barcelona, España) en PBS durante 30 minutos a TA.
- 3) Lavado en PBS: 1 de 10 minutos.
- 4) Bloqueo de las reacciones inespecíficas: los frotis se incuban en cámara húmeda con suero normal de cabra (MP Biomedicals, Ohio, EEUU) al 10% en PBS durante 30 minutos a TA.
- 5) Incubación del anticuerpo primario: se elimina el exceso de suero normal de cabra y se incuba el anticuerpo primario diluido en suero normal de cabra al 10% en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. El panel de anticuerpos primarios se detallan en la Tabla 1:

Anticuerpo	Clon	Dilución	Referencia	Fuente
CD68	Monoclonal (EBM11)	1:400	M0718	Dako
CD14	Monoclonal (CAM36A)	1:500	BOV2027	Monoclonal Antibody Center
iNOS	Policlonal	1:200	PA3-030A	Thermo
CD206	Policlonal	1:100	Orb4941	Byorbyt
CD83	Monoclonal (HB15e)	1:500	MCA1582	Bio-Rad
HLA-DR (MHC-II)	Monoclonal (TAL. 1B5)	1:50	M0746	Dako

Tabla 1. Relación de anticuerpos primarios utilizados en la técnica de inmunocitoquímica sobre frotis en congelación obtenidos a partir de pellet celular de líquido peritoneal. El anticuerpo monoclonal CD14 tiene reacción cruzada con tejido ovino de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos iNOS (Wood y cols., 2005), CD68 (Pinczowski y cols., 2017) y el CD206 (Ampem y cols., 2016) han mostrado reacción cruzada con tejidos ovinos.

- 6) Lavados en PBS-Tween (PBST): se añade Tween 20 (1:200) al PBS y se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- 7) Incubación del anticuerpo secundario biotilnado: Anti-ratón (goat anti-mouse biotinylated antibody, 0433, Dako, Glostrup, Dinamarca) si el anticuerpo primario está hecho en ratón, o Anti-conejo (goat anti-rabbit biotinylated antibody, 0432, Dako, Glostrup, Dinamarca) si el anticuerpo primario está hecho en conejo. La

dilución utilizada de ambos anticuerpos secundarios es 1:50 y 1:200, respectivamente, en suero normal de cabra diluido en PBS al 10%. La incubación de las preparaciones con el anticuerpo secundario se realiza durante 45 minutos en cámara húmeda y dentro de una estufa a 37°C.

- 8) Lavados en PBST: 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- 9) Complejo Avidina-Biotina-peroxidasa (Vectastain, ABC, Elite Kit): incubación con el complejo ABC a una dilución de 1:50 en PBS durante 1 hora en cámara húmeda, en oscuridad y a TA.
- 10) Lavados en PBST: 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- 11) Revelado con la solución de cromógeno (Vector, NovaRED, Peroxidase Substrate Kit): mezclar los reactivos de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se añaden 100 µl de la mezcla del cromógeno sobre el portaobjetos colocado sobre un fondo blanco y se revela durante 2 minutos máximo.
- 12) Frenado del proceso de revelado: lavar las preparaciones en agua corriente durante 10 minutos.
- 13) Contratinción: Las preparaciones se contratiñen durante 5 minutos con hematoxilina de Harris (Panreac, Barcelona, España) diluida al 10% con agua destilada.
- 14) Lavado: 3 minutos en agua corriente.
- 15) Deshidratación: mediante pases de 1 minuto por una serie ascendente de gradientes alcohólicos (70°, 96°, 100°), finalizando en dos pases de 1 minuto cada uno en xilol.

- 16)** Montaje de las preparaciones: Aplicación de una gota de Eukitt (Freiburg, Alemania) al cubreobjetos y dejándolo caer suavemente sobre la preparación.

3.3.2. Determinación y recuento diferencial de leucocitos peritoneales mediante técnicas de panóptico (Experimento 1) y de inmunocitoquímica con CD68 y tinción con eosina (Experimento 2).

- En el **experimento 1**, se tomó un frotis de líquido peritoneal de cada animal y se sometió a tinción con la técnica de panóptico, en la cual los frotis pasan primero por una solución fijadora y, después, por un colorante ácido, un colorante básico y, finalmente, por agua destilada. El tiempo en el que permanecen en cada solución es de 5 segundos. Por último, los frotis se deshidratan mediante pases de 1 minuto por una serie ascendente de gradientes alcohólicos (70°, 96°, 100°), finalizando en dos pases de 1 minuto cada uno en xilol y se montan utilizando un cubre y medio Eukitt (Freiburg, Alemania).
- En el **experimento 2**, se puso a punto una técnica novedosa para determinar de una forma más sencilla y precisa los diferentes tipos celulares presentes en cada muestra. Esta técnica consistió en la realización de la técnica inmunocitoquímica descrita en el Apartado 3.3.1. de Material y Métodos, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CD68 (M0718, Dako, Glostrup, Dinamarca) como marcador de macrófagos y la tinción con eosina (Panreac, Barcelona,

España) durante 1 minuto para la diferenciación de los eosinófilos como paso intermedio después de la contratinción con hematoxilina (paso 13 del apartado 3.3.1. de Material y Métodos) y antes del lavado durante 3 minutos en agua corriente (paso 14 del apartado 3.3.1. de Material y Métodos).

La metodología para la realización del recuento diferencial de leucocitos peritoneales fue la misma en ambos experimentos: utilizando un microscopio óptico y el objetivo de 40x, se tomaron microfotografías al azar de cada uno de los frotis de células peritoneales sometidos tanto a la técnica de tinción con panóptico como a inmunocitoquímica con CD68 y tinción con eosina. Las microfotografías fueron tomadas usando un fotomicroscopio Olympus BX51. Utilizando el Software biomédico Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, Estados Unidos) se realizó un “sorting” celular de cada una de las microfotografías tomadas. Primeramente, éste consistió en el conteo de todas las células presentes en una foto y, después, en la ordenación de éstas por tamaño. De manera que las células de mayor tamaño (macrófagos) aparecían en primeras posiciones de la línea de ordenamiento celular, con un núcleo basófilo y un color basófilo tenue de su citoplasma en el caso del panóptico, y un citoplasma rojizo en el caso de la tinción inmunocitoquímica (macrófagos positivos frente a CD68). Después, se sitúan los linfocitos (núcleo basófilo y citoplasma escaso y basófilo claro) y, por último, los eosinófilos (núcleo basófilo y citoplasma muy acidófilo, teñido por la eosina). La identificación de los diferentes tipos de leucocitos no sólo atendió a las características de tamaño y de color de sus citoplasmas, sino también a características morfológicas: los macrófagos poseen un núcleo en forma de herradura y posicionado normalmente en un extremo, con citoplasma amplio; los

linfocitos presentan un núcleo redondeado y escaso citoplasma y los eosinófilos poseen el núcleo bilobulado con citoplasma amplio y granular.

Un total de 200 leucocitos se contaron por animal, extrapolando este resultado a 100 (porcentaje) y se calculó la media \pm desviación estándar (DE) tanto del grupo no infectado como de los grupos infectados. Los neutrófilos no se incluyeron en los contajes diferenciales debido a su escaso número. En el caso de los anticuerpos CD14, CD206 e iNOS se realizó una evaluación de la intensidad de la inmunorreacción de manera semi-cuantitativa atendiendo a los siguientes indicadores: 1, leve; 2, medio; 3, intenso; 4, muy intenso.

3.3.3. Estudio inmunohistoquímico en muestras de hígado incluidas en parafina y detección de la expresión de los anticuerpos anti-periostina y anti-VCAM-1.

Este estudio se llevó a cabo exclusivamente con muestras de animales no infectados y de animales eutanasiados a los 18 dpi del **experimento 2**. Se utilizaron los cortes obtenidos como se ha descrito en el Apartado 3.2.3. de Material y Métodos. El procedimiento de la técnica de inmunohistoquímica es el siguiente.

- 1) Desparafinado: 3 baños en xilol de 10 minutos cada uno.
- 2) Comienzo de la rehidratación: 2 baños de 5 minutos cada uno en alcohol de 100°.
- 3) Inhibición de la peroxidasa endógena: 1 baño en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos en agitación y a TA.
- 4) Finalización de la rehidratación: 1 baño de 5 minutos cada uno en alcoholes (96° y 70°) y en agua destilada.
- 5) Lavado en PBS: 1 baño de 10 minutos.
- 6) Desenmascaramiento antigénico: se utilizaron dos pretratamientos diferentes:
 - Detección de periostina: 0,01 M tampón citrato sódico, pH 6, sometido a calor en microondas durante 20 minutos.
 - Detección de VCAM-1: tampón Tris-EDTA, pH 9, sometido a calor durante en microondas durante 30 minutos.

- 7) Lavados en PBS: 3 lavados de 10 minutos cada uno.
- 8) Bloqueo de las reacciones inespecíficas: se incubó con suero normal de cabra (ImmunoPure) al 20% en PBS durante 30 minutos en cámara húmeda a TA.
- 9) Lavados en PBS: 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- 10) Bloqueo de la biotina hepática endógena: se realiza utilizando el kit the bloqueo Avidina/Biotina (Vector Laboratories) durante 15 minutos en cada uno de los reactivos en cámara húmeda y a TA.
- 11) Lavados en PBS: 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- 12) Incubación en anticuerpo primario: el anticuerpo primario se diluyó 1:500 en suero normal de cabra al 10% en PBS y se aplicó a los frotis en cámara húmeda y en incubación durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:
 - Periostina: Anticuerpo policlonal anti-humano en conejo (Rabbit anti-Human periostin polyclonal antibody, LifeSpan BioSciences).
 - VCAM-1: Anticuerpo monoclonal anti-ratón en conejo (Rabbit anti-mouse monoclonal antibody VCAM-1, Abcam).
 - Para los controles, se usaron los mismos cortes añadiendo como anticuerpo primario suero preinmune de conejo.
- 13) Lavados en PBS: 3 lavados de 10 minutos cada uno.

- 14) Incubación del anticuerpo secundario biotilnado anti-conejo (goat anti-rabbit biotinylated antibody, 0432, Dako) a una dilución de 1:200 en suero normal de cabra al 10%. La incubación es de 30 minutos en cámara húmeda y a TA.
- 15) Lavados en PBS: 3 lavados de 10 minutos cada uno.
- 16) Complejo Avidina-Biotina-peroxidasa (Vectastain ABC Elite Kit): Incubación con el complejo ABC en una dilución de 1:50 en PBS durante una hora en cámara húmeda, en oscuridad y a TA.
- 17) Lavados en solución salina tris tamponada pH 7,6 (TBS/*Tris buffered saline*): 3 lavados de 10 minutos cada uno.
- 18) Revelado con la solución de cromógeno (Vector NovaRED Peroxidase Substrate Kit): Mezclar los reactivos de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se añade 100 µl de la mezcla del cromógeno sobre el portaobjetos colocado sobre un fondo blanco y revelar durante 2 minutos máximo.
- 19) Frenado del revelado: lavar las preparaciones en agua corriente durante 10 minutos.
- 20) Contratinción: Las preparaciones se contratiñeron con hematoxilina de Harris (Panreac) durante 5 segundos.
- 21) Lavado: 3 minutos en agua corriente.
- 22) Deshidratación: mediante pases de 1 minuto por una serie ascendente de gradientes alcohólicos (70°, 96°, 100°), finalizando en dos pases de 1 minuto cada uno en xilol.

- 23) Montaje de las preparaciones: Aplicación de una gota de Eukitt (Freiburg, Alemania) al cubreobjetos y dejándolo caer suavemente sobre la preparación.

3.4. NIVELES DE ANTICUERPOS EN EL LÍQUIDO PERITONEAL.

3.4.1. Detección de niveles de anticuerpos anti-catepsina L1 de *F. hepatica* (FhCL1) en el líquido peritoneal mediante ELISA.

Para la detección de niveles de anticuerpos anti-catepsina L1 de *Fasciola hepatica* en el líquido peritoneal, se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Nunc MaxiSorp), las cuales se tapizaron con 0.5 µg/ml de antígeno FhCL1 diluido en un tampón de carbonato-bicarbonato y se incubaron durante 13 horas a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST; pH 7,4) y se añadieron 200 µl por pocillo de buffer de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en PBST) y se incubó una hora a TA. Después de 3 lavados en PBST, se añadieron 100 µl del anticuerpo anti-FhCL1 diluido 1:6400 en PBST como control positivo (Collins y cols., 2004), y de las muestras de sobrenadante de líquido peritoneal previamente concentrado (apartado 2.2.2.1 de Material y Métodos) diluidas 1:6400 en PBST a las placas de microtitulación en triplicado y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de 4 lavados en PBST, la placa se incubó con 100 µl del anticuerpo anti-oveja conjugado con peroxidasa (polyclonal donkey anti-sheep IgG-horseradish peroxidase, Novex) diluido 1:10000 en PBST durante 1 hora a 37°C. Tras 5 lavados en PBST, se añadieron 100 µl de substrato TMB (3,3', 5,5' - Tetramethylbenzidine Liquid Substrate Supersensitive) en cada pocillo. Después de 15 minutos de incubación, la reacción se frenó con la

adición de 100 µl 2M de ácido sulfúrico. Tras la medición de la densidad óptica (OD) con el lector de placas PolarStar (BMG Labtech), se consideraron positivas las muestras de líquido peritoneal cuando el valor de densidad óptica (OD), determinado a una longitud de onda de 450 nm, fue mayor que la media de los valores de OD de las muestras de líquido peritoneal procedentes del grupo control no infectado más dos desviaciones estándar.

3.4.2. Detección de niveles de FhCL1 específicos de *F. hepatica* en el líquido peritoneal mediante inmunoblotting.

Las muestras del sobrenadante de líquido peritoneal previamente concentrado (apartado 2.2.2.1 de Material y Métodos) fueron sometidas a un proceso de desnaturalización proteica con dodecilsulfato sódico (SDS/*sodium dodecyl sulfate*) y, posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida. Esta técnica se utiliza para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética y en conjunto se denomina SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Los geles que se utilizaron con este fin fueron geles 4-12% NuPAGE Bis-Tris, junto con 5 µg de la proteína recombinante FhCL1 en 50 µl de tampón de muestra de dodecilsulfato de litio (NuPAGE LDS sample buffer). Después de la electroforesis, se procedió a la transferencia de las proteínas contenidas en el gel a una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,2 µm. Esta membrana se incubó primeramente con una solución de bloqueo, para bloquear las posibles uniones inespecíficas, que consistió en 5% de leche desnatada en polvo diluida en buffer salino con Tris y Tween 20 (TBST): 20 mM de Tris-hidrocloreto (Tris-HCl), 150 mM de cloruro sódico (NaCl) y 1% Tween 20; pH 7,0 y fue incubada con esta solución de bloqueo durante 1 hora a TA y en agitación. Posteriormente, se

añadió a la membrana el pool del líquido peritoneal concentrado procedente tanto del grupo control no infectado como del infectado y eutanasiado a los 18 dpi, diluidos 1:1000 en TBST; así como el anticuerpo anti-FhCL1 como control positivo, diluido también 1:1000 en TBST (Collins y cols., 2004). Después de 3 lavados de 10 minutos cada uno en TBST en agitación, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario policlonal anti-oveja conjugado con peroxidasa alcalina (polyclonal donkey anti-sheep IgG-Alkaline Phosphatase, Sigma) y diluido 1:5000 en TBST durante 1 hora y a TA en agitación, seguido de 3 lavados de 10 minutos cada uno en TBST. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron utilizando NBT/BCIP (Sigma), una combinación consistente en azul nitro-tetrazolio cloruro (NBT/nitroblue tetrazolium chloride) y 5-bromo-4-cloro-3'-indolil fosfato p-toluidina, sal (BCIP/5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine, salt), que produce un precipitado insoluble violeta oscuro cuando reacciona con la fosfatasa alcalina presente en los conjugados de anticuerpos.

3.5. DETERMINACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS EN LEUCOCITOS PERITONEALES.

3.5.1. Extracción de ARNm mediante miRNeasy Mini Kit y tratamiento con DNAasa.

Para la extracción del ARNm de las células del pellet celular procedente del líquido peritoneal (apartado 2.2.2.2 del Material y Métodos) de los animales control no infectados y los animales infectados y eutanasiados a los 18 dpi en el **experimento 1**, se utilizó un Kit comercial de Qiagen denominado miRNeasy Mini Kit y con el que se siguió el siguiente protocolo:

- 1) Se añadieron 700 µl de QIAzol (Qiagen) al pellet celular (3×10^6 células) del líquido peritoneal contenido en el eppendorf. Se mezcló bien (se utilizó un vortex) y se incubó durante 5 minutos a TA.
- 2) Se añadieron 140 µl de cloroformo y se volvió a mezclar de nuevo vigorosamente durante 15 segundos.
- 3) Incubación durante 3 minutos a TA.
- 4) Se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos y a 4°C, sin la opción de frenado de la centrifugadora. Se formará una solución trifásica en la que el sobrenadante de la parte superior contendrá el ARN, la fase de la mitad las proteínas y la fase del pellet contendrá ADN.
- 5) Para eliminar el posible ADN genómico presente en la muestra de ARN, lo tratamos con DNAsas mediante el reactivo TURBO-DNA-free (Thermo).
- 6) La cantidad de ARN es determinado mediante un Nanodrop (Thermo) y utilizando el kit Quant-IT Ribogreen RNA Reagent (Thermo).

3.5.2. Transcripción reversa de ARNm y realización de PCR a tiempo real (qRT-PCR).

La transcripción reversa del ARNm a ADN complementario (ADNc) se realizó usando SuperscriptTM II RNase H-Reverse Transcriptase y cebadores al azar (Life Technologies).

Para las reacciones de qPCR, se utilizaron 20 µl de volumen total para la reacción por triplicado, conteniendo 2 µl de ADNc diluido 1:20, 10 µl de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG kit (Life Technologies) y 1 µM de cada uno de los cebadores para ensayar la

expresión génica de distintas citoquinas. Las secuencias de cada uno de ellos se detallan en la Tabla 2.

Citoquina	Forward sequence (iniciadores de avance) 5'-3'	Reverse sequence (iniciadores inversos) 3'-5'	Referencia
IFN-γ	ATCTCTTTCGAGGCCGGAGA	ATTGCAGGCAGGAGAACCAT	Lacroux y cols., 2006.
IL-1	CACTGCCAGAAAATAAGCTGAAAC	TGATCAAGCAAATCGCCTGAT	Kuypers y cols., 2013
IL-4	GGAGCTGCCTGTAGCAGACG	TTCTCAGTTGCGTTCTTTGGG	Lacroux y cols., 2006
IL-5	CTGCTGATAGGTGATGGGAACCT	GGTGATTGTATGCTGAGGAGTAGG	Lacroux y cols., 2006
IL-10	CTGAGAACCATGGGCCTGAC	TCTCCCCCAGCGAGTTCAC	Lacroux y cols., 2006
IL-12	GAATTCTCGGCAGGTGGAAG	GTGCTCCACGTGTCAGGGTA	Lacroux y cols., 2006
IL-13	AGAACCAGAAGGTGCCGCT	GGTTGAGGCTCCACACCATG	Lacroux y cols., 2006
IL-17	TGTGAGGGTCAACCTGAACAT	TGATAATCGGTGGGCCTTCTG	Kuypers y cols., 2013
IL-23	GGGAAGTGGACAGAGGTTCC	CTGCCTCTCCAATCTGGGTG	Kuypers y cols., 2015
TNF-α	CCCGTCTGGACTTGATCCT	TGCTTTTGGTGCTCATGGTG	Lacroux y cols., 2006
TGFβ1	GAACTGCTGTGTTGTCGACG	GGTGTGCTGGTGTGACAGG	McNelly y cols., 2013
Arginasa	GCGGAAGTCAAGAAGACTGG	AGGTTGTCCATGCAAGTTCC	Propio del estudio \pm
iNOS	TAGAGGAACATCTGGCCAGG	TGGCAGGGTCCCCTCTGATG	Propio del estudio [^]
Eotaxina	ACAAGAAAAATCTGTGTTGATCCCC	CCATGGCATTCTGGACCC	Kuypers y cols., 2013
B2M	TTCTGTCCACGCTGAGTTCA	CAACCCAAATGAGGCATCGT	*

B-actina	ACCAGTTCGCCATGGATGA	AGCCGTTGTCAACCACGAG	Lacroux y cols., 2006
GAPDH	GGTGATGCTGGTGCTGAGTA	TCATAAGTCCCTCCACGATG	Kuypers y cols., 2013

Tabla 2. Cebadores (primers) utilizados en el análisis de citoquinas mediante qPCR. *Cortesía de Pacheco, I.L. ± basado en arginasa 1 de *Ovis aries* (XM_004011324). ^ basado en las secuencias bovinas descritas por Adler y cols., 1995, usando el gen de la óxido nítrico sintasa 2 de *Ovis aries* (XM_004012488).

La qPCR se realizó atendiendo a las siguientes condiciones de ciclos térmicos: primero, un ciclo de 95°C durante 10 minutos; seguido de 39 ciclos de: 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 15 segundos, 72°C durante 20 segundos y 72°C durante 5 minutos.

El análisis para el cálculo de la expresión relativa de cada gen se llevó a cabo mediante el método 2 delta-delta Ct propuesto por Pfaffl (Pfaffl y cols., 2001). Este método tiene como característica el tener en cuenta las eficiencias de la amplificación y permite así calcular de una manera más precisa la expresión relativa del gen de interés con respecto al de referencia. Este método es de gran utilidad puesto que también considera las variaciones intrínsecas entre los individuos de un mismo grupo experimental y no sólo las inducidas por las condiciones derivadas de la infección con *F. hepatica*. En este análisis Pfaffl se compararon los valores del ciclo umbral (Ct) de las muestras de interés frente a un control y fueron normalizadas con tres genes constitutivos: β -actina, B2M y GAPDH utilizando geNorm. geNorm es un algoritmo a partir del cual se puede calcular un factor de normalización de la expresión génica para cada muestra en función de la media geométrica de un número de genes de referencia definido por el usuario.

Para que este método se considerara como válido, se verificaron la eficiencia de amplificación de las reacciones individuales usando el paquete de cuantificación comparativa Rotor-Gene Q software v2.1.0. El análisis de la temperatura de hibridación (*annealing temperature*) y la curva de fusión (*melt-curve*) se determinaron para comprobar los productos de ADN simple producidos por este set de cebadores.

3.6. ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL LÍQUIDO PERITONEAL OVINO MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS.

Se llevó a cabo un análisis de los péptidos obtenidos del líquido peritoneal (Apartado 3.2.2.2.1. de Material y Métodos) mediante ionización por electrospray y espectrofotometría de masas en tándem (ES/MS-MS). Para ello, se utilizó una fuente de ionización mediante electrospray, y un Ekspert Nano LC 425 (Eksigent) acoplado a un espectrómetro de masas de tipo TripleTOF® 5600+ (AB Sciex). Los resultados de la huella peptídica fue generada por algoritmos de Paragon y Porgroup (Protein Pilot versión 5.0; Sciex) utilizando parámetros predeterminados.

Todos los espectros MS/MS fueron analizados con Mascot (versión 2.4.0.) y comparados con la base de datos de proteínas de oveja Uniprot (27174 entradas). Los principales parámetros iniciales de búsqueda fueron: tripsina como enzima, carbamidometilcisteína como modificación fija, posibilidad de dos cortes fallidos de enzima, tolerancia de 0,10 Da en los iones parental y fragmento y la oxidación de la metionina se especificó como una modificación variable.

Para validar la identificación de los péptidos y proteínas basados en la MS/MS se utilizó el software Scaffold (versión 4.6.2; Proteome Software

Inc). Los péptidos identificados eran aceptados si se establecían con una probabilidad de más del 95% de alcanzar una proporción de falsos positivos (FDR/*false Discovery rate*) menor del 1% mediante el algoritmo de Scaffold Local FDR. La probabilidad de las proteínas fue asignada mediante el uso del algoritmo Protein Prophet. Aquellas proteínas que no pudieron ser diferenciadas, basadas en el análisis MS/MS, pero que contenían péptidos similares, fueron agrupadas, atendiendo a los principios de la parsimonia. La abundancia de proteínas fue calculada mediante el software Scaffold y se basó en el protocolo de índice de abundancia de proteínas exponencialmente modificadas (emPAI) normalizado. Un valor mínimo de normalización de 0,05 fue añadido a todos los valores para compensar los valores nulos o negativos y para permitir la transformación de registro de los datos.

Las medias de los valores de emPAI procedentes de los replicados biológicos (se utilizó un segundo replicado biológico procedente de un experimento que se llevó a cabo en Queen's University Belfast de líquido peritoneal de ovejas no infectadas y ovejas infectadas y eutanasiadas a los 18 dpi) se usaron para el análisis estadístico de la abundancia de proteínas, calculándose la diferencia en aumento o disminución de veces de abundancia (*fold change*) de proteínas de los animales infectados en comparación con el grupo control no infectado.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

3.7.1. Análisis estadístico de resultados obtenidos con la técnica de inmunocitoquímica en frotis de líquido peritoneal.

En el estudio estadístico de los resultados de inmunocitoquímica se calcularon los parámetros descriptivos habituales (media y DE de cada grupo). Para comprobar si las distribuciones de los datos se ajustaban o no a una distribución normal se realizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov. La comparación entre grupos se realizó mediante una prueba T de Student para aquellos datos que se ajustaron a una distribución normal y la prueba U de Mann-Whitney para los datos que no se ajustaron. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante el test de ANOVA. En ambos casos, se consideró como significativo un nivel de $P < 0,05$. El software utilizado para la realización del estudio estadístico correspondió al paquete informático Graphpad Prism 7.0 software package (Graphpad Software, Inc., San Diego, California).

3.7.2. Análisis estadístico de los resultados de expresión génica y de proteómica.

Los resultados de expresión de citoquinas se analizaron estadísticamente utilizando los tests U de Mann Whitney y ANOVA de una cola con Tukey's post hoc en GraphPad Prism versión 6.00. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Los resultados de proteómica se sometieron a t-test pareado con comparaciones múltiples en el software Scaffold, y el valor de $P < 0.05$ fue

considerado estadísticamente significativo. El análisis de correlación para los datos de proteómica se realizaron con GraphPad Prism versión 6.00.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN EL LÍQUIDO PERITONEAL.

4.1.1. Respuesta inmunitaria de tipo celular.

4.1.1.1. Contaje absoluto de leucocitos peritoneales.

Los resultados del contaje absoluto de leucocitos peritoneales en los **experimentos 1 y 2** expresados en millones de células por mililitro ($\times 10^6$ céls/ml) y como media \pm DE de cada grupo se muestran en la Tabla 3.

En los **experimentos 1 y 2**, se observó un aumento estadísticamente significativo ($P < 0,05$) en el contaje absoluto de los leucocitos del líquido peritoneal a los 9 y 18 dpi en comparación con el grupo control no infectado (NI) de cada uno de estos dos experimentos. En concreto, en la **experiencia 1**, el contaje absoluto de leucocitos fue de 19×10^6 céls/ml $\pm 8,2$ a los 9 dpi y de $29,7 \times 10^6$ céls/ml $\pm 6,6$ a los 18 dpi, con un contaje absoluto de leucocitos en el grupo NI de $5,2 \times 10^6$ céls/ml $\pm 1,2$. En la **experiencia 2**, el contaje absoluto de leucocitos fue de $74,2 \times 10^6$ céls/ml $\pm 20,1$ a los 9 dpi y de $497,7 \times 10^6$ céls/ml ± 122 a los 18 dpi; mientras que en el grupo NI fue de 4×10^6 céls/ml $\pm 0,8$. Según se puede observar, este aumento fue mucho más marcado en el **experimento 2**, existiendo en este último diferencias significativas ($P < 0,01$) en la cantidad de leucocitos a los 3 dpi ($7,4 \times 10^6$ céls/ml $\pm 1,4$), 9 dpi ($74,2 \times 10^6$ céls/ml $\pm 20,1$) y 18 dpi ($497,9 \times 10^6$ céls/ml ± 122) en comparación con el **experimento 1**, (3 dpi: $2,1 \times 10^6$ céls/ml $\pm 0,5$; 9 dpi: 19×10^6 céls/ml $\pm 8,2$; 18 dpi: $29,7 \times 10^6$ céls/ml $\pm 6,6$).

En contraposición, en el **experimento 1**, a los 1 dpi (2×10^6 céls/ml $\pm 0,5$) y 3 dpi ($2,1 \times 10^6$ céls/ml $\pm 0,5$), se observó una disminución

significativa ($P<0,05$) en el conteaje absoluto de leucocitos en comparación con el grupo NI ($5,2 \times 10^6$ céls/ml $\pm 1,2$). Sin embargo, este resultado no tuvo lugar en el **experimento 2**, en el que el conteaje a los 1 y 3 dpi fue de $3,3 \times 10^6$ céls/ml $\pm 1,6$ y $7,4 \times 10^6$ céls/ml $\pm 1,4$, respectivamente, representando ambos un incremento ligero y sin cambios significativos con respecto al grupo NI (4×10^6 céls/ml $\pm 0,8$).

	NI	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
Exp. 1	5,2 \pm 1,2	2 \pm 0,5*	2,1 \pm 0,5*	19 \pm 8,2*	29,7 \pm 6,6 ^Ø
Exp. 2	4 \pm 0,8	3,3 \pm 1,6	7,4 \pm 1,4 [§]	74,2 \pm 20,1 ^Ø ⌘	497,9 \pm 122 ^Ø §

Tabla 3. Contaje absoluto de leucocitos peritoneales ($\times 10^6$ células/ml) en el grupo control no infectado (NI) y en los animales infectados y eutanasiados a los 1, 3, 9 y 18 dpi en los experimentos (**Exp.**) 1 y 2, expresados como media \pm DE. *Diferencia estadísticamente significativa ($P<0,05$), ^Ø($P<0,01$) con respecto al grupo NI. [§]Diferencia significativa ($P<0,01$); ⌘($P<0,05$) del **experimento 2** con respecto al **experimento 1**.

4.1.1.2. Contaje diferencial de leucocitos peritoneales.

4.1.1.2.1. Contaje diferencial expresado en porcentaje.

Los resultados del conteaje diferencial de leucocitos peritoneales en los **experimentos 1 y 2** expresados en porcentaje y como media \pm DE de cada grupo se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 8.

En los **experimentos 1 y 2**, la mayoría de los leucocitos peritoneales, tanto en el grupo control no infectado como a los 1 y 3 dpi, estaba representada por macrófagos, seguida por linfocitos y con presencia ocasional de eosinófilos.

En el **experimento 1**, tuvo lugar un aumento significativo ($P<0,01$) en el porcentaje de linfocitos a los 9 dpi ($60,5\% \pm 18,1$) en comparación con

el resultado para este tipo celular en el grupo NI ($40,7\% \pm 18,6$). Sin embargo, en estos 9 dpi se produjo una disminución ($P < 0,01$) en el porcentaje de macrófagos ($12,1\% \pm 5,5$), hecho que también ocurre a los 18 dpi ($P < 0,05$) ($25,8\% \pm 28,2$), ambos resultados en comparación al grupo NI ($55,8\% \pm 19$). Con respecto al porcentaje de eosinófilos, se observó un aumento significativo ($P < 0,05$) a los 9 dpi ($24,3\% \pm 14,7$) y a los 18 dpi ($P < 0,01$) ($49,2\% \pm 24$) en comparación con el grupo NI ($2,1\% \pm 1,9$).

En el **experimento 2** se produjo, a los 9 dpi, un aumento significativo ($P < 0,05$) en el porcentaje de linfocitos ($63,6\% \pm 16$), aunque este resultado disminuye ($P < 0,05$) a los 18 dpi ($15,5\% \pm 7,8$), ambos en comparación al porcentaje de linfocitos en el grupo NI ($39,4\% \pm 10,6$). Tuvo lugar una disminución ($P < 0,001$) en el porcentaje de macrófagos a los 9 dpi ($18\% \pm 6,3$) y a los 18 dpi ($11,4\% \pm 3,9$) respecto al grupo NI ($56\% \pm 11,1$). Con respecto al porcentaje de eosinófilos, éste aumentó de manera significativa ($P < 0,05$) a los 9 dpi ($18,1\% \pm 10,5$) y a los 18 dpi ($P < 0,001$) ($72,9\% \pm 10,9$) con respecto al porcentaje de eosinófilos que presentó el grupo NI ($4,4\% \pm 4,2$).

No se encontraron diferencias en el porcentaje de linfocitos, macrófagos y eosinófilos en la comparación estadística realizada entre los **experimentos 1 y 2**.

Exp. 1	NI	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
Linfocitos	40,7±18,6	35,3±35,3	44,1±11,5	60,5±18,1 [§]	24,1±19,5
Macrófagos	55,8±19	61,3±13,8	53,3±11,5	12,1±5,5 [§]	25,8±28,2*
Eosinófilos	2,1±1,9	1,3±2,4	2,2±2,6	24,3±14,7*	49,2±24 [§]

Exp. 2	NI	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
Linfocitos	39,4±10,6	35,6±12	46,4±20,4	63,6±16*	15,5±7,8*
Macrófagos	56±11,1	64,1±11,7	50,9±22,6	18±6,3 [□]	11,4±3,9 [□]
Eosinófilos	4,4±4,2	0,2±0,3	2,3±2,5	18,1±10,5*	72,9±10,9 [□]

Tabla 4. Contaje diferencial de leucocitos peritoneales (linfocitos, macrófagos y eosinófilos) expresados como porcentajes de la media±DE de los grupos NI y 1, 3, 9 y 18 dpi en los **Experimentos (Exp.) 1 y 2**. *Diferencia significativa *(P<0,05), §(P<0,01), □(P<0,001).

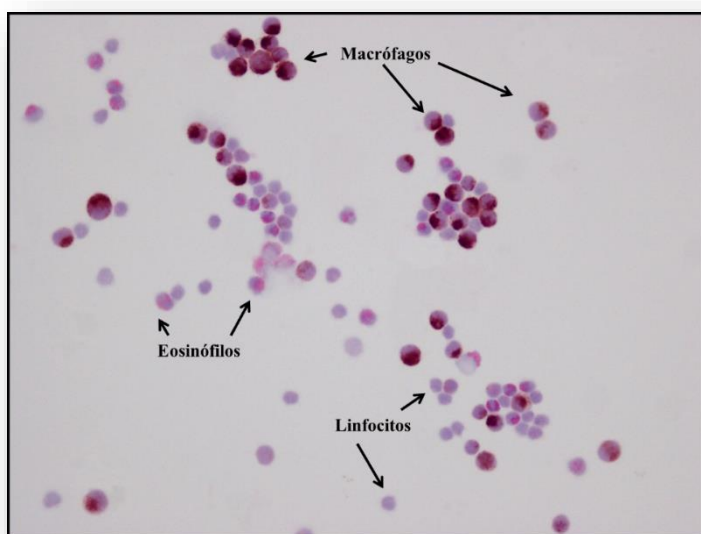


Figura 7. Microfotografía (x100 aumentos) de frotis de líquido peritoneal de un animal 9 dpi del **experimento 2** sometidos a técnica de inmunocitoquímica con CD68 y tinción con hematoxilina-eosina (Apartado 3.2. de Material y Métodos). En ambas microfotografías se pueden diferenciar linfocitos (núcleo basófilo y citoplasma tenue y escaso), macrófagos (núcleo ovoide y citoplasma rojizo-inmunorreactivo frente a CD68) y eosinófilos (núcleo basófilo bilobulado y citoplasma acidófilo).

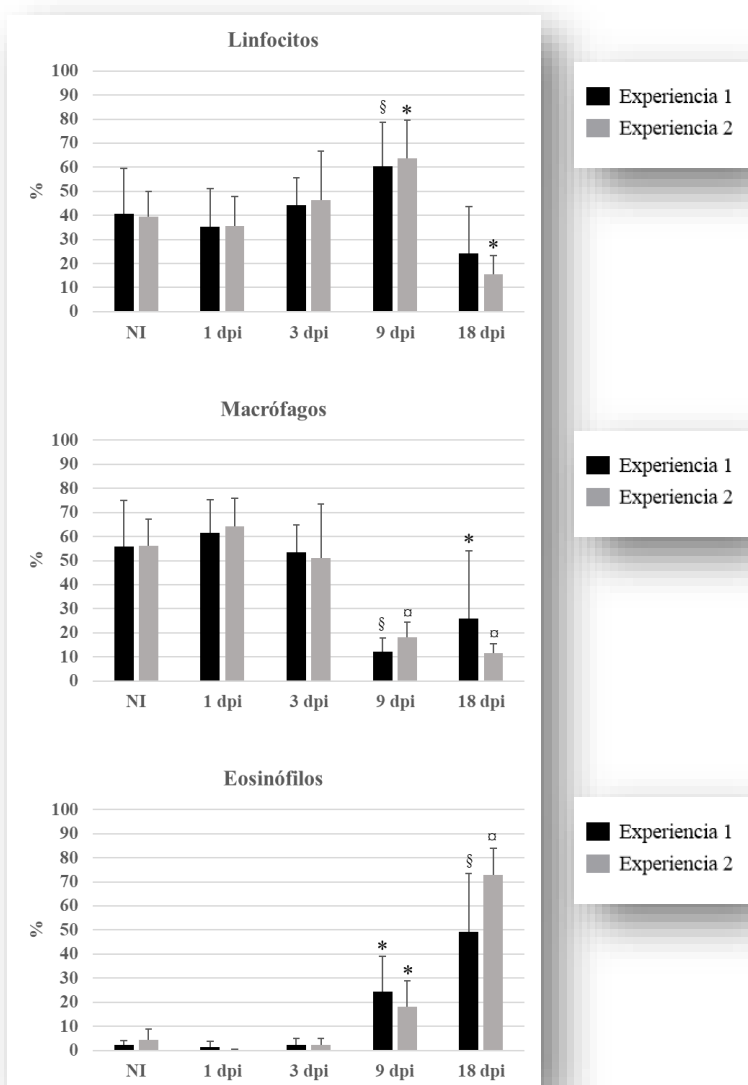


Figura 8. Contaje diferencial de leucocitos peritoneales (linfocitos, macrófagos y eosinófilos) expresados como porcentajes de la media \pm DE de los grupos NI y 1, 3, 9 y 18 dpi en los **experimentos 1 y 2** (barras negra y gris, respectivamente). Diferencia significativa: ^{*}($P<0,05$), [§]($P<0,01$), [□]($P<0,001$) con respecto al grupo NI.

4.1.1.2.2. Contaje diferencial absoluto.

Con los resultados del contaje absoluto de leucocitos peritoneales y del contaje diferencial expresado en porcentaje de leucocitos peritoneales, se pudo calcular el contaje diferencial absoluto de leucocitos peritoneales multiplicando el porcentaje de cada tipo celular por el contaje absoluto de leucocitos peritoneales. El contaje diferencial absoluto se expresó en millones de células por mililitro ($\times 10^6$ céls/ml). Los valores de estos resultados están representados en la Tabla 5.

En el **experimento 1**, se observó un incremento significativo ($P < 0,001$) a los 9 dpi ($12,7 \times 10^6$ céls/ml $\pm 2,5$) y a los 18 dpi ($P < 0,05$) ($7,1 \times 10^6$ céls/ml $\pm 5,7$) en el contaje diferencial absoluto de linfocitos peritoneales en comparación con el grupo NI ($1,6 \times 10^6$ céls/ml $\pm 0,9$). Con respecto al número de macrófagos, tuvo lugar una disminución significativa al 1 dpi ($P < 0,01$) ($1,2 \times 10^6$ céls/ml $\pm 0,2$), 3 dpi ($P < 0,001$) ($1,1 \times 10^6$ céls/ml $\pm 0,2$) y 9 dpi ($P < 0,05$) ($1,6 \times 10^6$ céls/ml ± 1) con respecto al grupo NI ($3,1 \times 10^6$ céls/ml $\pm 0,6$). Sin embargo, el contaje diferencial absoluto de macrófagos a los 18 dpi aumenta a los 18 dpi ($7,6 \times 10^6$ céls/ml $\pm 8,4$) en comparación con el grupo NI ($3,1 \pm 0,6$), aunque este último cambio no es significativo. El número de eosinófilos disminuyó ($P < 0,01$) al 1 dpi ($0,02 \times 10^6$ céls/ml $\pm 0,04$) y a los 3 dpi ($P < 0,05$) ($0,04 \times 10^6$ céls/ml $\pm 0,05$), pero aumentó ($P < 0,01$) a los 9 dpi ($3,9 \times 10^6$ céls/ml $\pm 2,1$) y a los 18 dpi ($P < 0,01$) ($14,6 \times 10^6$ céls/ml $\pm 7,1$) en comparación con el grupo NI ($0,3 \times 10^6$ céls/ml $\pm 0,5$).

En el **experimento 2**, se produjo un aumento de linfocitos ($P < 0,05$) a los 3 dpi y a los 9 dpi ($P < 0,001$) ($48,5 \times 10^6$ céls/ml $\pm 9,6$) y 18 dpi ($p < 0,01$) ($77,3 \times 10^6$ céls/ml $\pm 38,8$) en comparación con el grupo NI ($1,5 \times 10^6$ céls/ml

$\pm 0,4$). El conteaje absoluto de macrófagos aumentó de manera significativa ($P < 0,001$) a los 9 dpi ($13,4 \times 10^6$ céls/ml $\pm 4,7$) y a los 18 dpi ($57,2 \times 10^6$ céls/ml $\pm 19,5$) con respecto al grupo NI ($2,2 \times 10^6$ céls/ml $\pm 0,4$). El número de eosinófilos aumentó ($P < 0,01$) a los 9 dpi ($13,4 \times 10^6$ céls/ml $\pm 7,8$) y de manera muy acusada, a los 18 dpi ($P < 0,001$) ($363,4 \times 10^6$ céls/ml $\pm 54,4$) en comparación con el grupo NI ($0,1 \times 10^6$ céls/ml $\pm 0,1$).

Exp. 1	NI	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
Linfocitos	1,6 \pm 0,9	0,7 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	12,7 \pm 2,5 [□]	7,1 \pm 5,7*
Macrófagos	3,1 \pm 0,6	1,2 \pm 0,2 [§]	1,1 \pm 0,2 [□]	1,6 \pm 1*	7,6 \pm 8,4
Eosinófilos	0,3 \pm 0,5	0,02 \pm 0,04 [§]	0,04 \pm 0,05*	3,9 \pm 2,1 [§]	14,6 \pm 7,1 [§]
Exp. 2	NI	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
Linfocitos	1,5 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	3,4 \pm 1,5*	48,5 \pm 9,6 [□]	77,3 \pm 38,8 [§]
Macrófagos	2,2 \pm 0,4	2,1 \pm 0,3	3,7 \pm 1,6	13,4 \pm 4,7 [□]	57,2 \pm 19,5 [□]
Eosinófilos	0,1 \pm 0,1	0,005 \pm 0,01	0,2 \pm 0,1	13,4 \pm 7,8 [§]	363,4 \pm 54,4 [□]

Tabla 5. Contaje diferencial absoluto de leucocitos peritoneales expresados en millones de células/ml ($\times 10^6$ céls/ml). Diferencia significativa: *($P < 0,05$), §($P < 0,01$), □($P < 0,001$) con respecto al grupo NI.

4.1.1.3. Estudio del inmunofenotipado de los macrófagos y células dendríticas del líquido peritoneal mediante inmunocitoquímica.

4.1.1.3.1. Estudio en macrófagos de los marcadores CD14, CD206 e iNOS

- **Anticuerpo monoclonal anti-CD14.**

El marcador CD14 es una glicoproteína de membrana identificada en la superficie de macrófagos que tiene un papel importante tanto en la eliminación de células apoptóticas como en la iniciación de respuestas inflamatorias (Simmons y cols., 1989; Ulevitch y cols., 1995).

Los resultados, expresados en porcentaje de macrófagos positivos frente a CD14 en las **experiencias 1 y 2**, están representados en la Figura 10 y en la Tabla 6. Los resultados obtenidos con este anticuerpo mostraron un patrón de inmunorreacción citoplasmático granular en aquellos leucocitos peritoneales con abundante citoplasma y núcleo redondeado-ovoide, células de características morfológica similares a las que presentaron positividad frente al anticuerpo anti CD68 (macrófagos).similares a las que presentaron positividad frente al anticuerpo anti-CD68 (macrófagos) (Figura 9A y B).

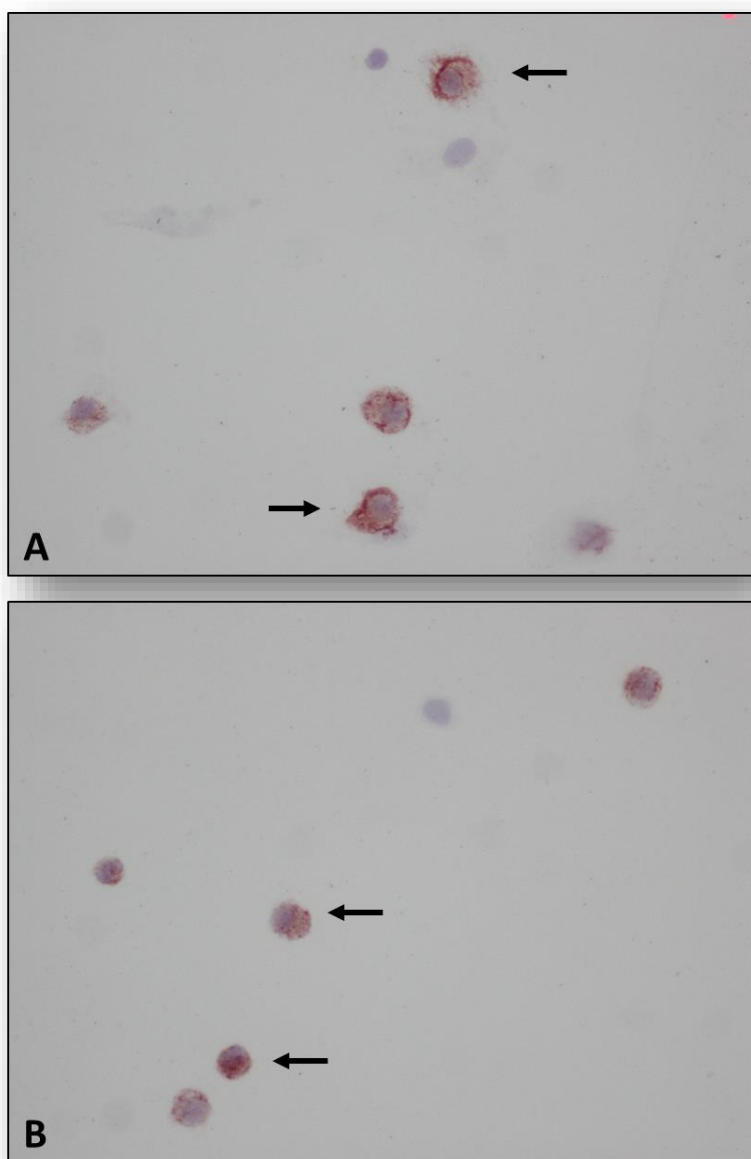


Figura 9 A y B. Microfotografías de frotis de líquido peritoneal a x100 aumentos a x400 aumentos de animales de 3 dpi **(A)** y 18 dpi **(B)** del **experimento 2** sometidos a inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-CD14. Se observa una inmunorreacción (color rojizo) en el citoplasma de macrófagos peritoneales (flechas).

Tanto en el **experimento 1** como en el **experimento 2**, se observó un aumento en el número de macrófagos positivos frente a CD14 a los 3, 9 y 18 dpi con respecto al grupo NI. Concretamente, en el **experimento 1**, tuvo lugar un aumento significativo ($P<0,05$) en el porcentaje de macrófagos positivos frente a CD14 en las ovejas a los 3 dpi ($71,6\%\pm 10,2$), a los 9 dpi ($59,7\%\pm 10,3$) y a los 18 dpi ($88,7\%\pm 2,3$) con respecto al grupo control no infectado ($16,1\%\pm 7,8$). De manera similar, en el **experimento 2** tuvo lugar un aumento significativo ($P<0,05$) en el porcentaje de macrófagos CD14 positivos en los animales de los grupos 3 dpi ($78,1\%\pm 13,1$), 9 dpi ($74,5\%\pm 16,9$) y 18 dpi ($69\%\pm 11,1$) con respecto al grupo control no infectado ($51,2\%\pm 11,1$).

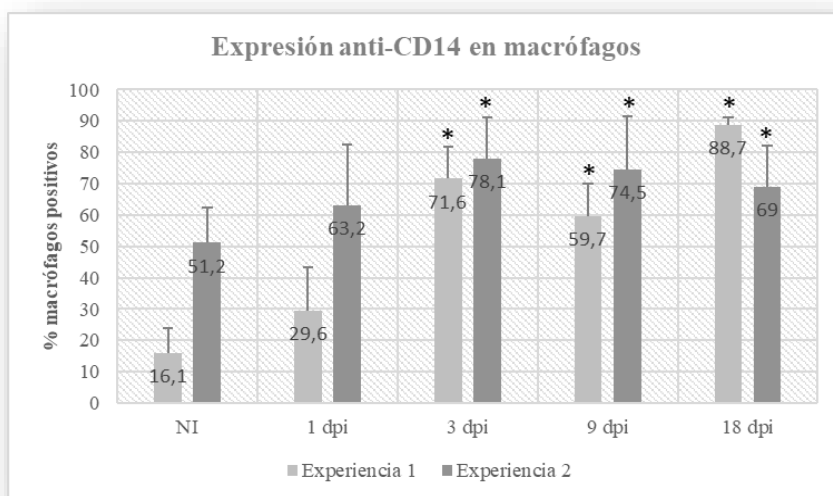


Figura 10. Porcentaje de macrófagos peritoneales positivos frente a CD14 expresados como la media \pm DE de los grupos NI, 1, 3, 9 y 18 dpi en **las experiencias 1 y 2**. Diferencia significativa $*(P<0,05)$ con respecto al grupo control NI.

Además, se realizó una valoración semi-cuantitativa de la intensidad de la inmunorreacción en los **experimentos 1 y 2**, empleando la siguiente graduación según la intensidad: 1, leve; 2, media; 3, intensa; 4, muy intensa.

Los macrófagos sometidos a inmunocitoquímica frente a CD14 en los **experimento 1 y 2** presentan una inmunorreacción citoplasmática muy intensa a los 3, 9 y 18 dpi, siendo esta inmunorreacción de grado leve en los frotis de los animales del grupo control no infectado (Tabla 6).

CD14	NI	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
Exp. 1	16,1±7,8 (2)	29,7±13,7 (3)	72±10,3 (4)	59,7±10,3 (4)	88,7±2,3 (4)
Exp. 2	51,2±11 (2)	63,2±19 (2)	78,1±13,1 (4)	74,6±16,9 (4)	69,1±12,9 (4)

Tabla 6. Porcentaje de macrófagos positivos frente a CD14 expresados como la media±DE de los grupos NI y 1, 3, 9 y 18 dpi en los **experimentos (Exp.) 1 y 2**. La valoración semi-cuantitativa de la intensidad de inmunorreacción se indica entre paréntesis (1, leve; 2, media; 3, intensa; 4, muy intensa).

- **Anticuerpo policlonal anti-CD206.**

El receptor de manosa o CD206 es una lectina de tipo C que pertenece al grupo de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs/*Pattern Recognition Receptors*) presentes en la superficie de los macrófagos y que identifican patógenos (Underhill y Ozinsky, 2002). Recientemente, se ha descrito la validez que posee el CD206 como marcador de macrófagos activados por la vía alternativa o M2 (Ampem y cols., 2016).

Los resultados expresados en porcentaje de macrófagos positivos frente a CD206 en las **experiencias 1 y 2**, están representados en la Figura 12 y en la Tabla 7.

En nuestro trabajo, la reacción frente al anticuerpo anti-CD206 se presentó en el citoplasma de células de morfología compatible con macrófagos, tal y como se observó con los anticuerpos anti-CD14 y anti-CD68, siendo el patrón de inmunorreacción de tipo granular (Figura 11A, B, C y D).

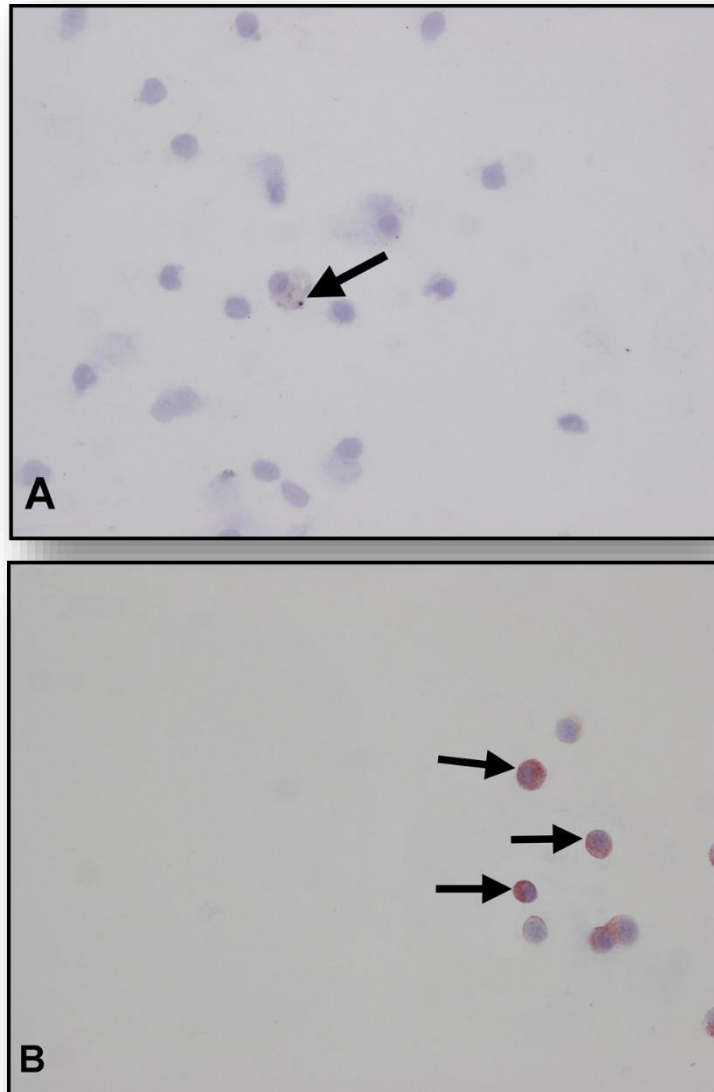


Figura 11 A y B. Microfotografías (x400 aumentos) de frotis de líquido peritoneal del **experimento 2** sometidos a inmunocitoquímica frente a CD206. **(A)**; frotis de animal del grupo NI con un macrófago cuya inmunorreacción citoplasmática es leve (flecha). **(B)** frotis de animal 1, en que la intensidad de inmunorreacción citoplasmática es elevada en los macrófagos (flechas).

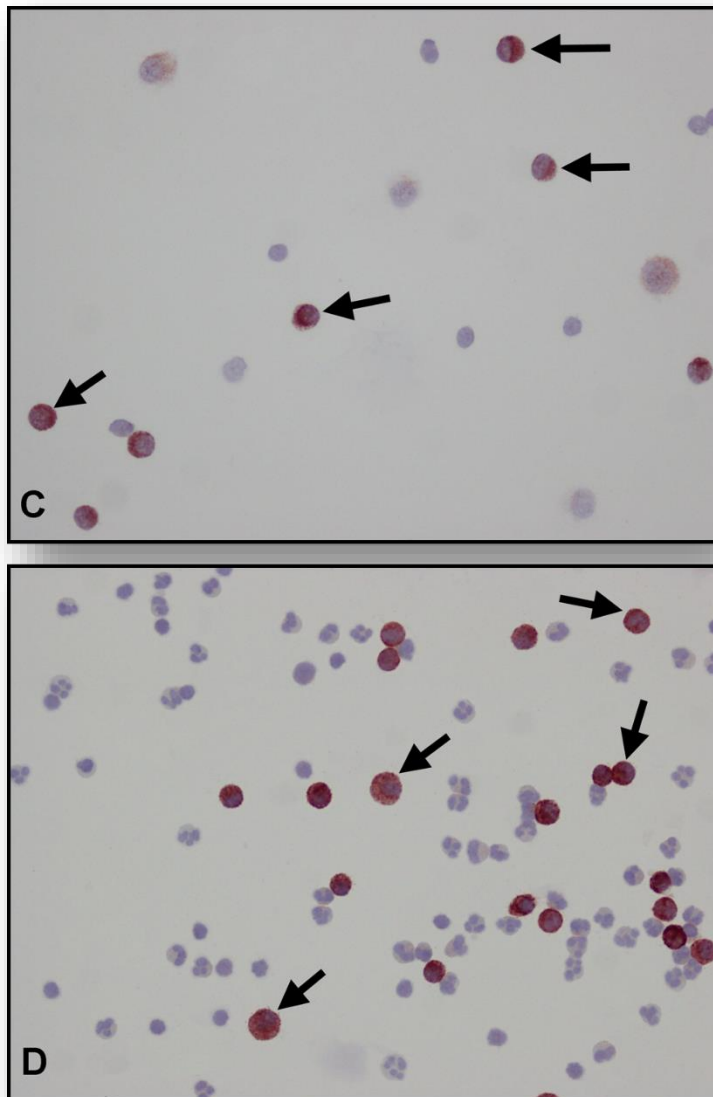


Figura 11 C y D. Microfotografías (x400 aumentos) de frotis de líquido peritoneal del **experimento 2** sometidos a inmunocitoquímica frente a CD206. Frotis de animal del grupo 9 dpi (**C**) y 18 dpi (**D**, en los que la intensidad de inmunorreacción citoplasmática es elevada en los macrófagos (flechas).

En el **experimento 1**, el porcentaje de macrófagos peritoneales que expresaron positividad frente a CD206 incrementó de manera significativa ($P<0,05$) en los animales de los grupos 1 dpi ($69,2\%\pm6,3$), 3 dpi ($71,3\%\pm17,3$), 9 dpi ($59,4\%\pm6,3$) y 18 dpi ($70,7\%\pm8$) en comparación con el grupo NI ($25,3\%\pm2,3$). De manera similar, en el **experimento 2** también se produce un incremento de macrófagos positivos frente a CD206 a los 1 dpi ($81,4\%\pm8,6$), 3 dpi ($83,9\%\pm15,4$), 9 dpi ($87\%\pm5,7$) y 18 dpi ($90,9\%\pm8$) en comparación con el grupo NI ($20,9\%\pm4,4$).

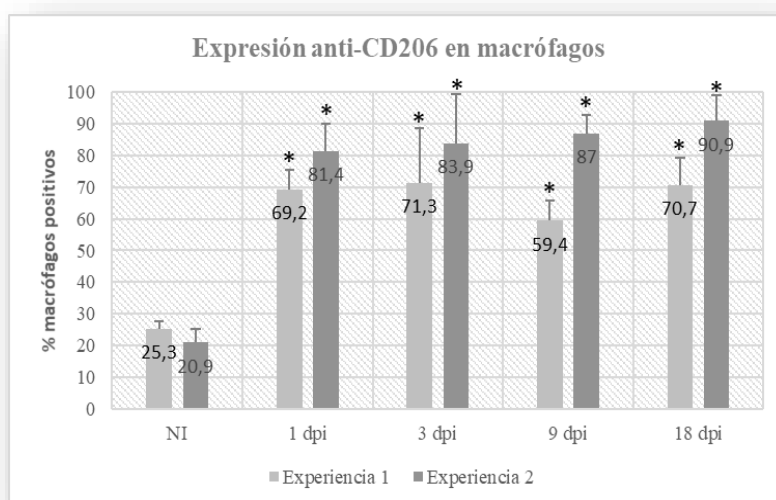


Figura 12. Porcentaje de macrófagos positivos frente a CD206 expresados como la media \pm DE de los grupos NI, 1, 3, 9 y 18 dpi en los **experimentos 1 y 2**. Diferencia significativa $*(P<0,05)$ con respecto al grupo control NI.

En los **experimentos 1 y 2**, el anticuerpo anti-CD206 mostró una intensidad de inmunorreacción leve en los macrófagos peritoneales del grupo control no infectado. Sin embargo, la expresión de este anticuerpo

adquirió una tinción muy intensa en los macrófagos peritoneales de los animales pertenecientes a los grupos 1, 3, 9 y 18 dpi (Figura 5; Tabla 6).

CD206	NI	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
Exp. 1	25,3±2,3 (1)	69,2±6,3 (4)	71,3±17,3 (4)	59,5±6,3 (4)	70,8±8 (4)
Exp. 2	20,9±4,4 (1)	81,5±8,6 (4)	83,9±15,4 (4)	87±5,7 (4)	90,9±8 (4)

Tabla 7. Porcentaje de macrófagos positivos frente a CD206 expresados como la media±DE de los grupos NI y 1, 3, 9 y 18 dpi en los **experimentos (Exp.) 1 y 2**. La valoración semi-cuantitativa de la intensidad de inmunorreacción se indica entre paréntesis (1, leve; 2, media; 3, intensa; 4, muy intensa).

- **Anticuerpo policlonal anti- iNOS.**

El anticuerpo anti-iNOS se utilizó como marcador de aquellos macrófagos activados de manera clásica (M1) (Kurt y cols., 2014; Zhou y cols., 2014).

Los resultados expresados en porcentaje de macrófagos positivos frente a iNOS en las **experiencias 1 y 2**, están representados en la Figura 14 y en la Tabla 8.

Los resultados obtenidos con el uso de este anticuerpo constataron una inmunorreacción de tipo granular en el citoplasma de células de morfología compatible con macrófagos y, de manera ocasional, en células de morfología compatible con eosinófilos.

El conteo se realizó incluyendo solamente las células con morfología de macrófagos (Figura 13A, B, C y D).

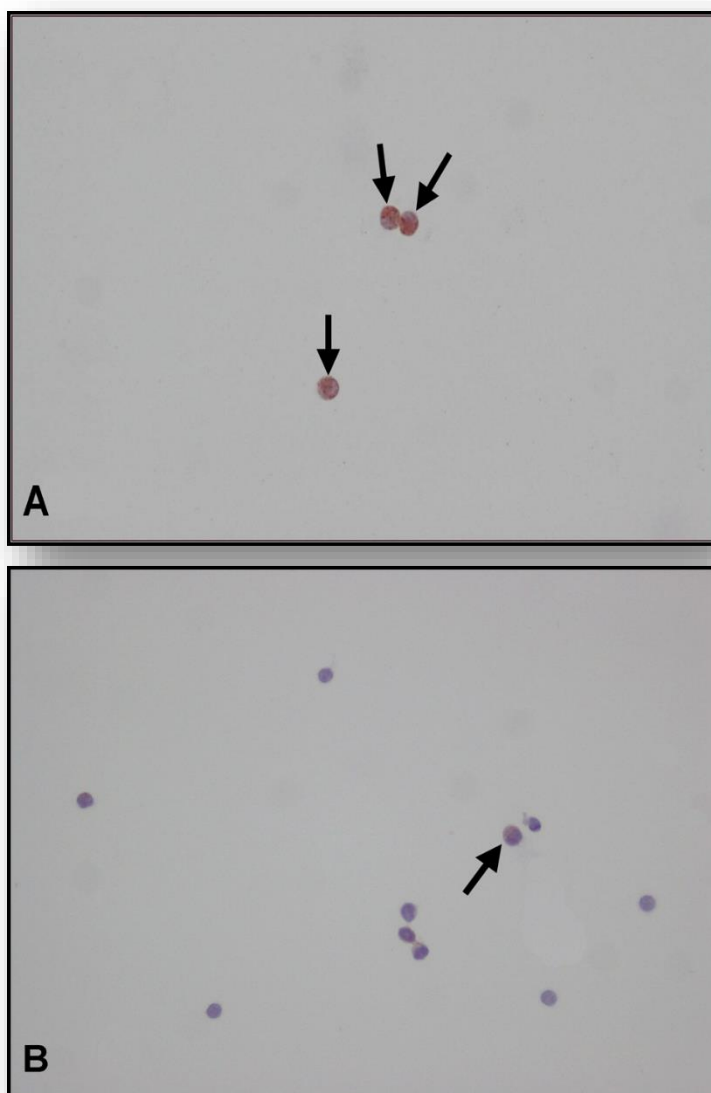


Figura 13 A y B. Microfotografías (x400 aumentos) de frotis de líquido peritoneal del **experimento 2** sometidos a inmunocitoquímica frente a iNOS. Se observa una inmunorreacción (color rojizo) leve en el citoplasma de macrófagos peritoneales (flechas) del grupo NI (**A**) y una intensidad de inmunorreacción leve-moderada a los 1 dpi (**B**).

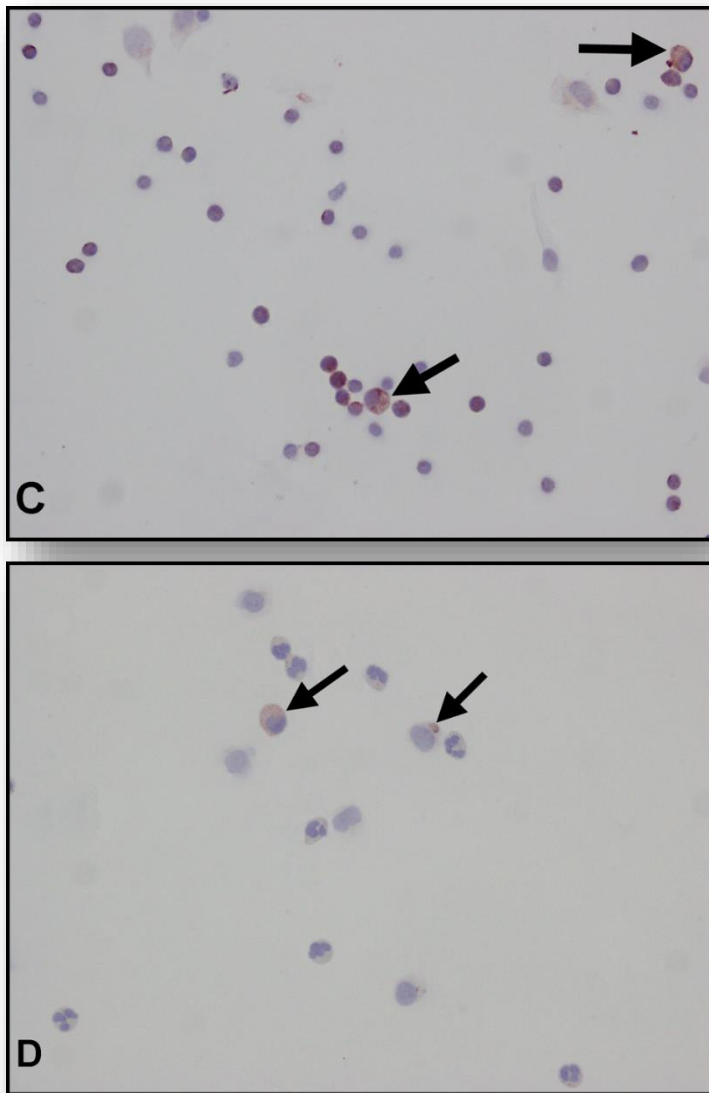


Figura 13 C y D. Microfotografías (x400 aumentos) de frotis de líquido peritoneal del **experimento 2** sometidos a inmunocitoquímica frente a iNOS. Se observa una inmunorreacción de intensidad leve-moderada a los 9 dpi (**C**) y 18 dpi (**D**).

Con respecto a los resultados del porcentaje de macrófagos en los animales infectados en comparación con el grupo NI, cabría destacar que en el **experimento 1** tuvo lugar un incremento significativo ($P<0,05$) de macrófagos positivos frente a iNOS a los 3 dpi ($70,7\%\pm 9,2$). En el **experimento 2**, se constató también un incremento significativo ($P<0,05$), pero esta vez a los 9 dpi ($74,4\%\pm 9,4$).

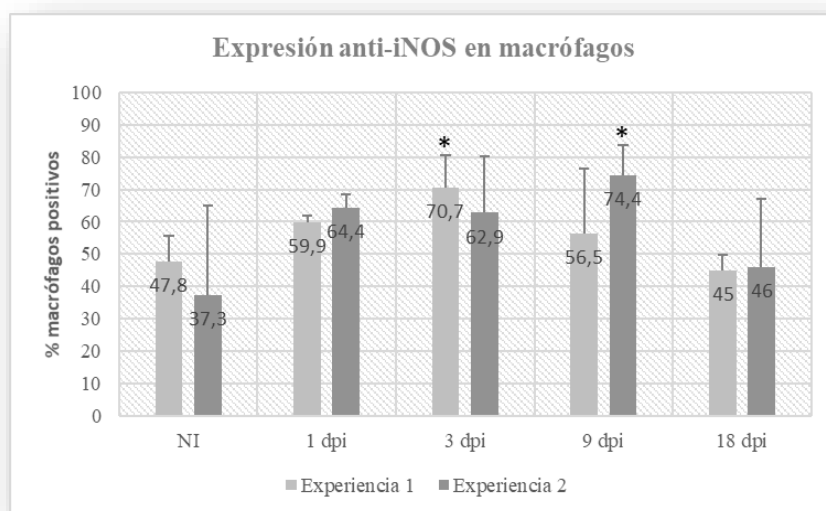


Figura 14. Porcentaje de macrófagos positivos frente a iNOS expresados como la media \pm DE de los grupos NI, 1, 3, 9 y 18 dpi en los **experimentos 1 y 2**. Diferencia significativa $*(P<0,05)$ con respecto al

La intensidad de la inmunorreacción citoplasmática en los macrófagos positivos frente a iNOS fue leve leve en ambos experimentos, tanto en el grupo control no infectado como en los macrófagos a los 1, 3, 9 y 18 dpi (Tabla 8).

iNOS	NI	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
Exp. 1	47,8±7,8 (1)	59,9±1,9 (1)	70,7±9,2 (1)	56,5±19,8 (1)	45±4,7 (1)
Exp. 2	37,3±27 (1)	64,4±4,1 (1)	62,9±17,5 (1)	74,4±9,4 (2)	46±21,2 (1)

Tabla 8. Porcentaje de macrófagos positivos frente a iNOS expresados como la media±DE de los grupos NI y 1, 3, 9 y 18 dpi en los **experimentos** (Exp.) **1** y **2**. La valoración semi-cuantitativa de la intensidad de inmunorreacción se indica entre paréntesis (1, leve; 2, media; 3, intensa; 4, muy intensa).

4.1.1.3.1.1. Ratio iNOS/CD206.

Dado que los anticuerpos anti-iNOS y anti-CD206 son marcadores de los macrófagos activados de manera clásica o alternativa, respectivamente, se calculó la ratio iNOS/CD206 para demostrar de una manera más precisa que el curso de la infección con *F. hepatica* promueve la activación alternativa de los macrófagos en detrimento de una activación clásica de éstos. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

En el **experimento 1**, la ratio iNOS/CD206 disminuyó respecto al grupo NI un 53,6% al 1 dpi, un 52,6% a los 3 y 9 dpi, y un 69,4% a los 18 dpi (Tabla 9). Estos resultados sugieren que ya desde el 1 dpi se está produciendo una disminución notable de la ratio iNOS/CD206, continuándose esta disminución en los 3 y 9 dpi y acentuándose a los 18 dpi en comparación con el grupo NI.

En el **experimento 2**, la ratio iNOS/CD206 disminuyó exactamente un 56,6% a los 1 y 3 dpi respecto a los valores encontrados en el grupo NI, un 50% a los 9 dpi y un 72,2% a los 18 dpi, confirmando los resultados del experimento 1.

<i>i</i> NOS/CD206	NI	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
<i>Exp. 1</i>	1,9	0,9 (53,6)	1,0 (48,4)	1,0 (48,4)	0,6 (69,4)
<i>Exp. 2</i>	1,8	0,8 (56,6)	0,8 (56,6)	0,9 (50)	0,5 (72,2)

Tabla 9. Ratio *i*NOS/CD206 en los experimentos (**Exp.**) 1 y 2. En paréntesis se muestra el porcentaje de disminución respecto al control no infectado (NI).

4.1.1.3.2. Estudio en las células dendríticas (CDs) con el marcador CD83.

El anticuerpo anti-CD83 se ha descrito como un marcador de CDs maduras (Zhou y cols., 1992).

Los resultados expresados en porcentaje de CDs positivas frente a CD83 en las **experiencias 1 y 2**, están representados en la Figura 16.

Las células que fueron positivas frente a este anticuerpo presentaban un patrón de inmunorreacción granular citoplasmático (Figura 15A y B).

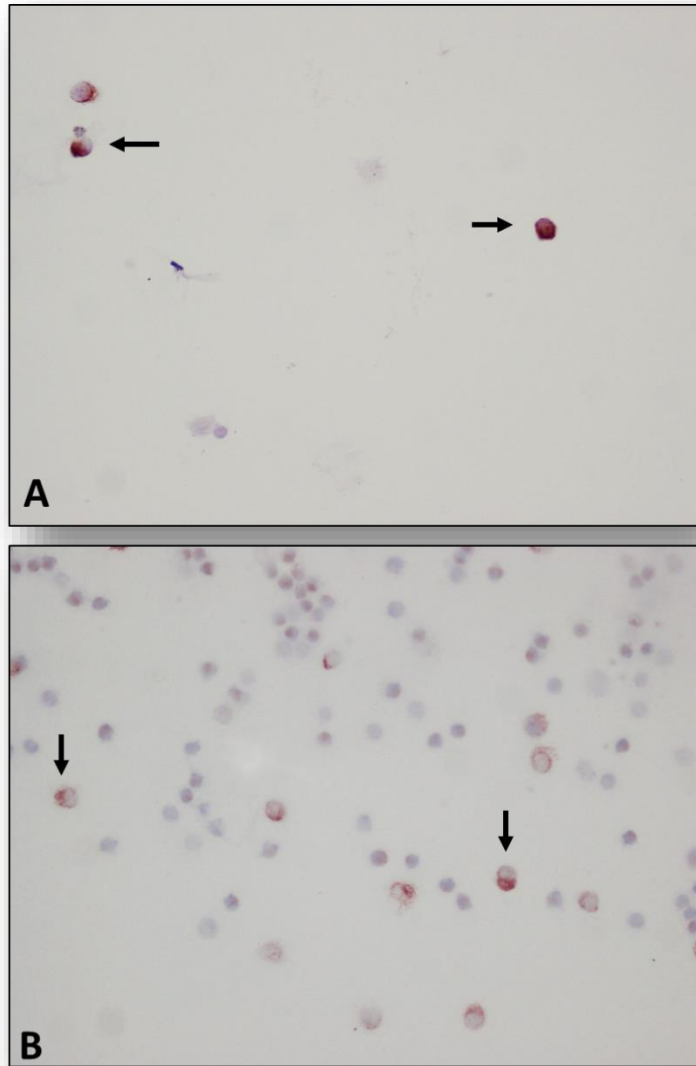


Figura 15. Microfotografías (x100 aumentos) de frotis de líquido peritoneal del **experimento 2** sometidos a inmunocitoquímica frente a CD83. Se observa una inmunorreacción (color rojizo) intensa en el citoplasma de macrófagos peritoneales (flechas) del grupo 1 dpi (**A**) y de 18 dpi (**B**).

En lo que respecta a los resultados expresados en porcentaje de CDs positivas frente a CD83 en los **experimentos 1 y 2**, cabría destacar que en el **experimento 1** existió un incremento significativo ($P < 0,05$) del porcentaje de CDs frente a CD83 a los 1 dpi ($65,8\% \pm 8,3$), 3 dpi ($53,7\% \pm 11,3$), 9 dpi ($42,5\% \pm 11$) y 18 dpi ($59,7\% \pm 22,5$) con respecto al grupo NI ($26 \pm 3,1$). Por otro lado, los resultados de CDs positivas en el **experimento 2** son los siguientes: 1 dpi ($58,5\% \pm 20,2$), 3 dpi ($64\% \pm 18,3$), 9 dpi ($63,3\% \pm 12,4$), 18 dpi ($46,6\% \pm 13,5$) y grupo NI ($37,3\% \pm 27,4$). Aunque la tendencia en la expresión del anticuerpo anti-CD83 en el **experimento 2** es el aumento a lo largo del experimento durante los 1, 3, 9 y 18 dpi en comparación con el grupo NI, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. En el análisis de este último dato, habría que tener en consideración que existe una elevada variabilidad individual en los resultados en el **experimento 2** frente a este anticuerpo en los animales del grupo NI expresados en porcentaje de la media \pm DE.

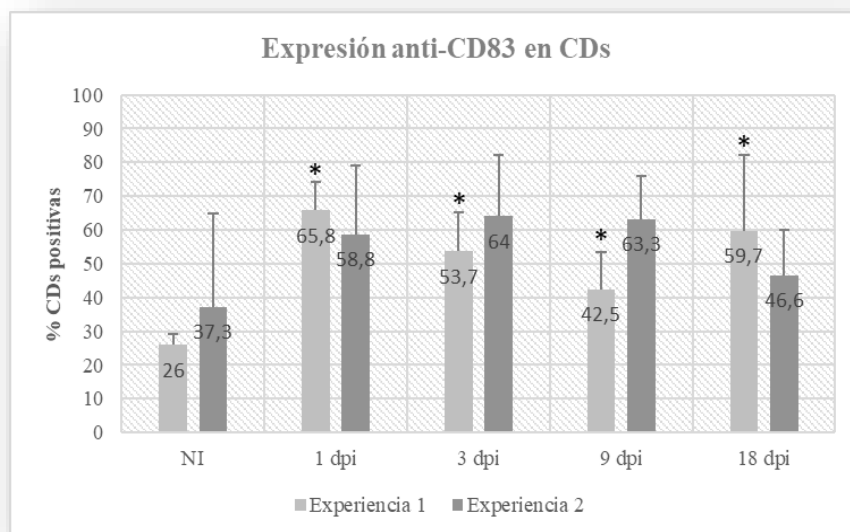


Figura 16. Porcentaje de CDs positivos frente a CD83 expresados como la media \pm DE de los grupos NI, 1, 3, 9 y 18 dpi en los **experimentos 1 y 2**.

*Diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al grupo control NI.

4.1.1.3.3. Expresión de MHC clase II en macrófagos peritoneales.

El complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II) es una proteína transmembranal heterodimérica que se expresa en la superficie de las células presentadoras de antígenos y su función principal es la de presentar péptidos antigénicos a los receptores de las células T (Barclay y cols., 1997).

Los resultados expresados en porcentaje de macrófagos positivos frente a MHC-II en las **experiencias 1 y 2**, están representados en la Figura 18.

En anticuerpo monoclonal anti-MHC II mostró inmunorreacción granular citoplasmática con refuerzo de membrana principalmente en células grandes, de núcleo redondo o escotado y citoplasma amplio, morfología consistente con la de macrófagos (Figura 17A y B).

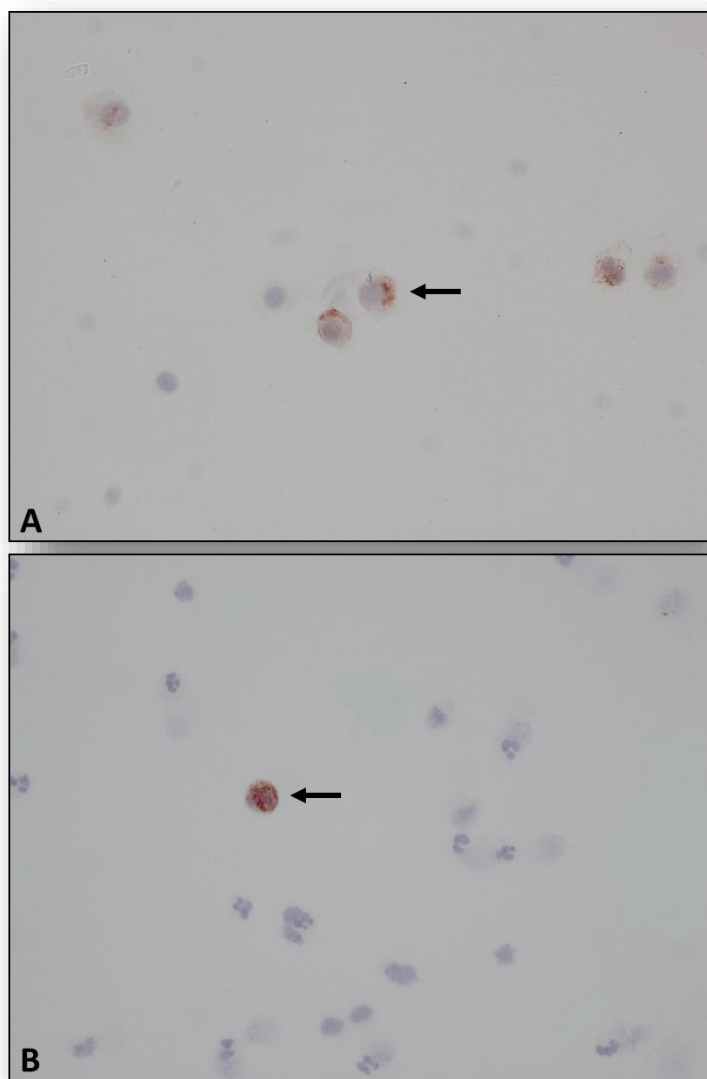


Figura 17. Microfotografías (x400 aumentos) de frotis de líquido peritoneal del **experimento 2** sometidos a inmunocitoquímica frente a MHC-II. Se observa una inmunorreacción (color rojizo) intensa en el citoplasma de células peritoneales (flechas) del grupo 3 dpi (**A**) y de 18 dpi (**B**).

En menor proporción también mostró expresión en células más pequeñas de núcleo esférico y basófilo y citoplasma escaso (linfocitos), que no fueron incluidos en los contajes.

Los resultados obtenidos en la **experiencia 1** confirmaron un aumento significativo ($P < 0,05$) en los días 1 dpi ($60,4\% \pm 7,1$), 3 dpi ($53,8\% \pm 8,6$), 9 dpi ($46,9\% \pm 19,9$) y 18 dpi ($40\% \pm 4$) en comparación con el grupo NI ($15,6\% \pm 7,1$). Sin embargo, este dato no se confirmó en la **experiencia 2**, en la cual no solo no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en la expresión de MHC-II en este tipo de células en el transcurso de infección en comparación con el grupo control no infectado sino que, además, existió una elevada variabilidad individual y una tendencia general a la disminución en el porcentaje de macrófagos peritoneales positivos a lo largo de la infección. Los resultados en la **experiencia 2** de macrófagos peritoneales positivos frente a MHC-II fueron los siguientes: 1 dpi ($16,8\% \pm 24,4$), 3 dpi ($31,8\% \pm 19$), 9 dpi ($22,7\% \pm 9,4$), 18 dpi ($34,9\% \pm 8,6$) y grupo NI ($39,1\% \pm 24$).

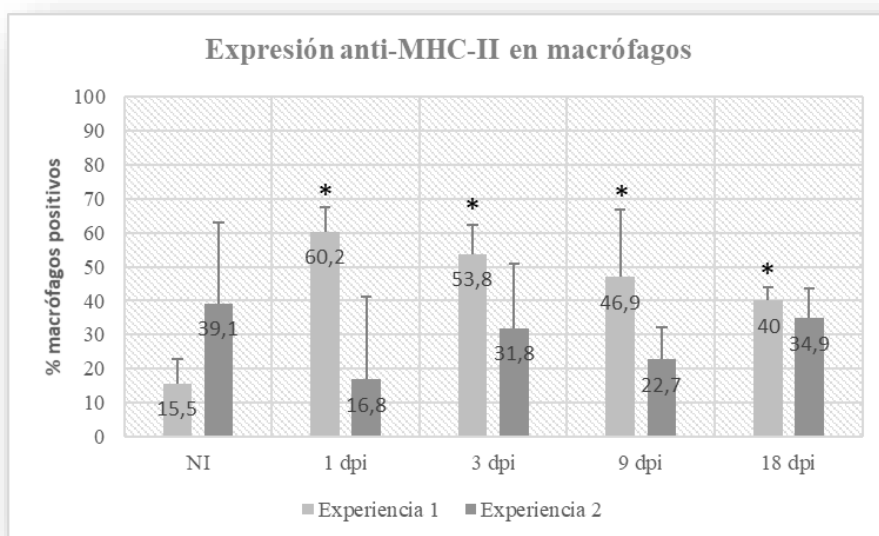


Figura 18. Porcentaje de células positivas frente a MHC-II expresados como la media \pm DE de los grupos NI, 1, 3, 9 y 18 dpi en los **experimentos 1 y 2**.

*Diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al grupo control NI.

4.1.1.4. Estudio de la expresión génica de citoquinas en leucocitos del líquido peritoneal mediante PCR tiempo real (qRT-PCR).

A partir de los transcritos de ARNm obtenidos de las células peritoneales mediante transcripción reversa, se realizó un estudio mediante PCR a tiempo real (qRT-PCR) para determinar y cuantificar el perfil de citoquinas ovinas expresadas por las células inmunocompetentes presentes en el líquido peritoneal del grupo de animales infectados y eutanasiados a los 18 dpi y de los del grupo control no infectado del **experimento 1**.

La mayoría de los cebadores utilizados en este estudio se obtuvieron a partir de la literatura. Sin embargo, otros cebadores fueron específicamente diseñados como parte de este estudio, utilizando secuencias de genes de

citoquinas ovinas disponibles (Apartado 3.5.2. de Material y Métodos, Tabla 2).

La expresión de las citoquinas IL-1, IL-4 e IL-5, así como la quimiocina denominada eotaxina, no se detectó en las muestras analizadas del grupo control no infectado ni del grupo infectado a los 18 dpi (Figura 19).

Sin embargo, el análisis mediante qPCR determinó una elevada expresión génica de las citoquinas IL10, IL-12, IL-13, IL-23 y TGF- β , así como una disminución en la expresión génica de las citoquinas IFN γ , IL-17, y las enzimas iNOS y Arginasa, en las muestras procedentes de los animales infectados (18 dpi) en comparación con las muestras de los animales del grupo NI y en relación a tres genes constitutivos utilizados: β -actina, beta-2-microglobulina (B2M) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Sin embargo, estos cambios no fueron significativos.

Sin embargo, a pesar de que los niveles de estas cinco citoquinas (IL10, IL-12, IL-13, IL-23 y TGF- β) resultaron ser muy elevados en el grupo infectado a los 18 dpi, resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas, debido a la alta variabilidad existente entre animales. Lo mismo ocurre con las citoquinas IFN γ , TNF α , IL-17, y las enzimas iNOS y Arginasa que, a pesar de disminuir con respecto al grupo control no infectado, no representan un cambio estadísticamente significativo. Que no haya diferencias significativas podría ser consecuencia de la elevada variabilidad individual existente en cada grupo de animales.

El análisis de la expresión génica relativa y cuantitativa de citoquinas en líquido peritoneal, representada como expresión normalizada en escala logarítmica en base 10 (\log_{10}) del número de veces que cambia un resultado

del grupo infectado 18 dpi con respecto al grupo NI, se representa en la Figura 19. La abundancia del transcrito del marcador inmunitario del grupo infectado 18 dpi se normalizó frente a la abundancia de los respectivos transcritos del grupo NI, siendo la abundancia en el grupo infectado 18 dpi igual a 1 (Figura 19).

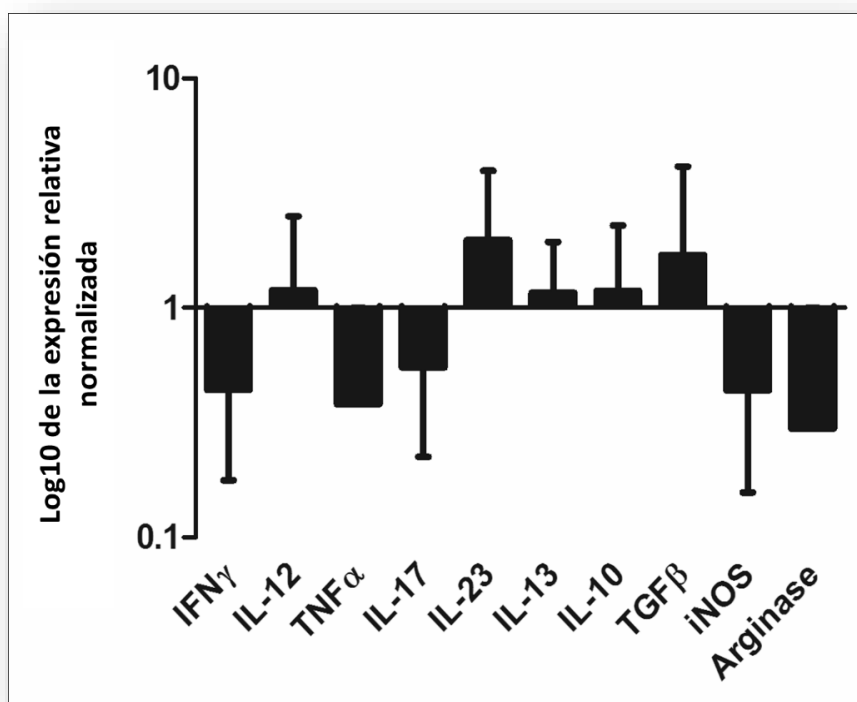


Figura 19. Análisis de la expresión génica relativa y cuantitativa de citoquinas en líquido peritoneal, representada como expresión normalizada en escala logarítmica en base 10 /log10) del número de veces que cambia un resultado del grupo infectado 18 dpi con respecto al grupo NI. Los datos están respresentados por la media \pm DE de los cambios en la abundancia de los transcritos estudiados (fold change) en relación a los genes cconstitutivos: β -actina, B2M Y GAPDH.

4.1.2. Estudio de la respuesta inmunitaria de tipo humoral.

Los resultados de la respuesta inmunitaria humoral en el líquido peritoneal en el **experimento 1** en el grupo control no infectado y en el grupo infectado a los 18 dpi se muestran en la [Figura 20](#).

Los resultados de la técnica de inmunoblotting para la detección de anticuerpos específicos frente a la catepsina L1 de *F. hepatica* (rFhCL1)

constataron la presencia de estos anticuerpos en el líquido peritoneal de animales infectados (18 dpi). Sin embargo, no se detectaron anticuerpos específicos frente a rFhCL1 en los animales del grupo control no infectado. (Figura 20, A).

La determinación llevada a cabo mediante técnica de ELISA del nivel de respuesta de IgG total en el líquido peritoneal frente a rFhCL1 resultó en la obtención de niveles estadísticamente significativos ($P < 0,01$) en el líquido peritoneal de los animales 18 dpi en comparación con el grupo control no infectado (Figura 20, B).

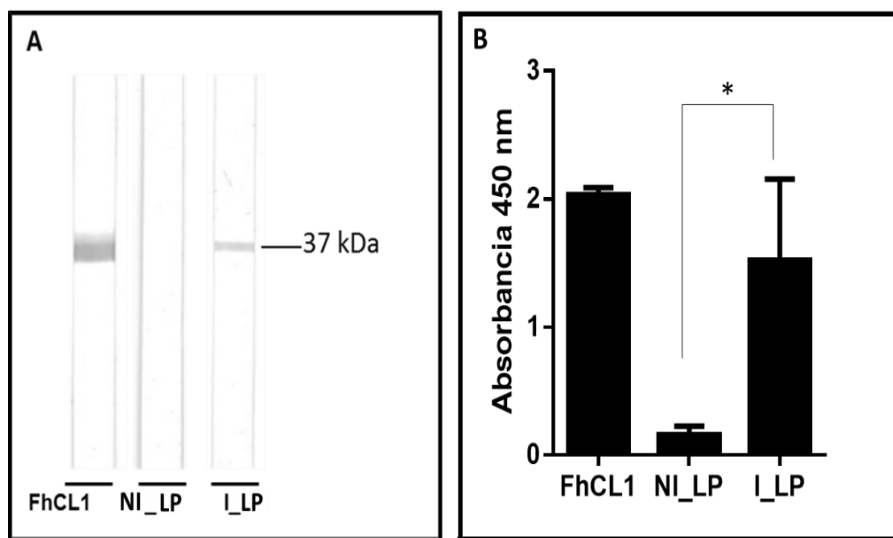


Figura 20. Análisis de la respuesta inmunitaria de tipo humoral en el líquido peritoneal en el experimento 1. (A) Detección de anticuerpos específicos frente a rFhCL1 en el líquido peritoneal mediante inmunoblotting. (B) Nivel de respuesta IgG en líquido peritoneal frente a rFhCL1, determinada por el nivel de absorbancia a 450 nm mediante ELISA. FhCL1: Control positivo de rFhCL1; NI_LP: Líquido peritoneal (LP) procedente de un pool (n=5) de animales del grupo control no infectado (NI); I_LP: LP procedente de un pool (n=5) de animales infectados y eutanasiados a los 18 dpi (I). Las barras (B) representan la media \pm DE de cada pool (n=5) por triplicado. *Diferencia significativa ($P<0,01$).

4.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL LÍQUIDO PERITONEAL.

Los resultados del análisis proteómico se obtuvieron a partir de las muestras de líquido peritoneal obtenido en el **experimento 1**, procedente de animales control no infectados y de animales infectados y sacrificados a los 18 dpi junto con un replicado biológico. Este replicado biológico consistió en muestras de líquido peritoneal procedentes tanto de animales control no infectados como de animales 18 dpi y procesadas mediante el mismo procedimiento descrito en los Apartados 3.2.2.2 y 3.2.2.2.1. de Material y

Métodos y fueron obtenidas de un experimento llevado a cabo en Queen's University (Belfast, Reino Unido).

El análisis proteómico del líquido peritoneal reveló un total de 176 proteínas, basadas en al menos dos péptidos únicos, presentes en el líquido peritoneal de los animales infectados a los 18 dpi en comparación con los animales del grupo control no infectado (ver [Anexo 1](#)).

Para ello, se separaron las proteínas mediante electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y después cortando fracciones por encima y por debajo de las proteínas predominantes del hospedador (albúmina de 67 kDa) ([Figura 21](#)).

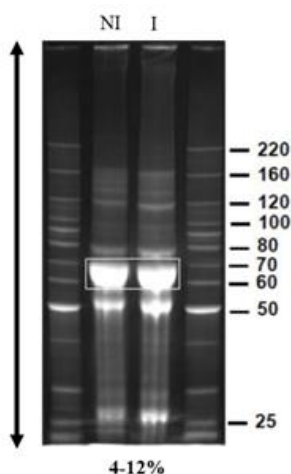


Figura 21. Electroforesis en gel 4-12% SDS-PAGE del “pool” de líquido peritoneal de los animales no infectados (NI) y del pool de los animales infectados (I). El recuadro blanco indica la posición de la albúmina. Los guiones indican las secciones (kDa) del gel usadas para el análisis proteómico.

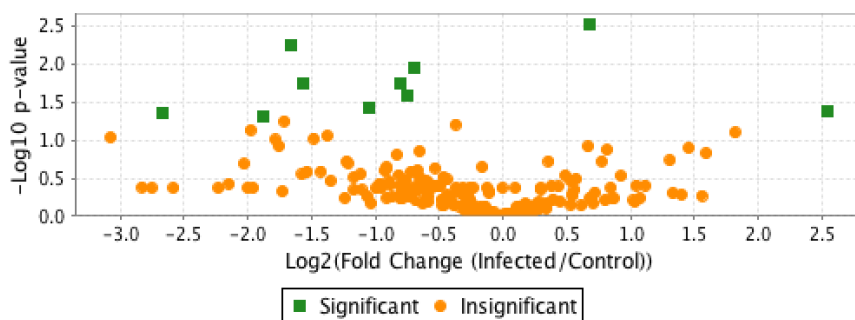


Figura 22. Volcano plot análisis de las diferencias estadísticamente significativas (significant) entre los animales no infectados y los infectados, resaltadas en verde ($P < 0,05$).

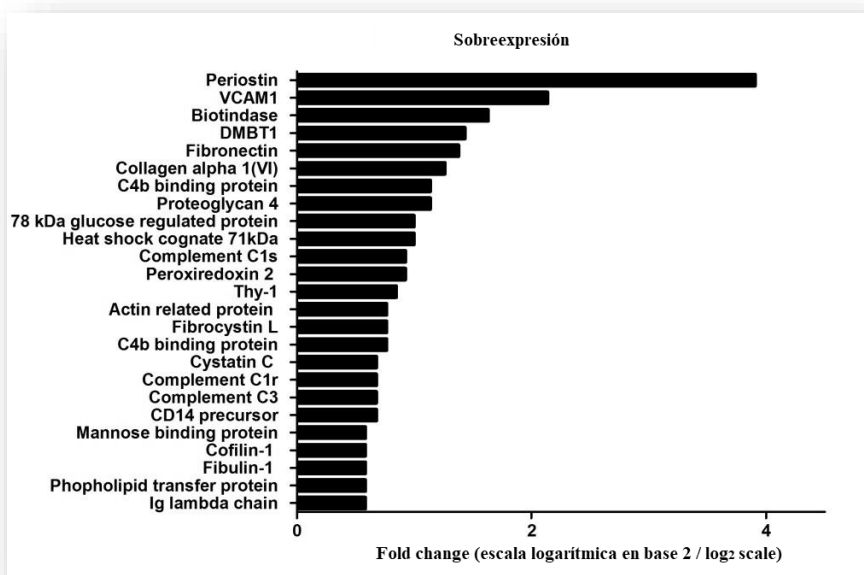


Figura 23. Representación de las proteínas identificadas en el líquido peritoneal que mostraron sobreexpresión en los animales infectados (18 dpi), basada en la concentración de proteína. El fold change, representado en una escala logarítmica en base 2 (\log_2 scale), se calculó en base a las diferencias en la concentración de proteína (valores emPAI) entre las muestras de líquido peritoneal de los grupos no infectado e infectado.

Entre las proteínas identificadas en el líquido peritoneal, se encontraron proteínas procedentes del hígado con funciones estructurales, como proteínas de la matriz extracelular, del tejido conectivo y del epitelio, incluyendo el colágeno VI, fibronectina y fibrocistina. Además, se identificaron también inmunoglobulinas y factores del sistema del complemento. Las proteínas resultantes del estudio proteómico se clasificaron atendiendo a su procedencia y funcionalidad en los siguientes grupos:

A. Proteínas relacionadas con la sangre y el sistema inmunitario (Figura 24): Teniendo en cuenta el número de veces que aumenta la cantidad de cada proteína en el líquido peritoneal de animales infectados (18 dpi) en comparación con el de animales no infectados, cabe destacar la cadena alfa de la proteína de unión C4b (2,2 veces), el subcomponente C1s del sistema del complemento (2,1 veces) y el precursor del clúster de diferenciación antigénica de monocitos CD14 (1,7 veces). En cuanto a aquellas proteínas cuya cantidad disminuye a los 18 dpi en comparación con el grupo no infectado, cabría destacar la proteína C4 del sistema del

complemento (0,3) y la tetranectina (0,4). A pesar de estos cambios, no existieron diferencias significativas.

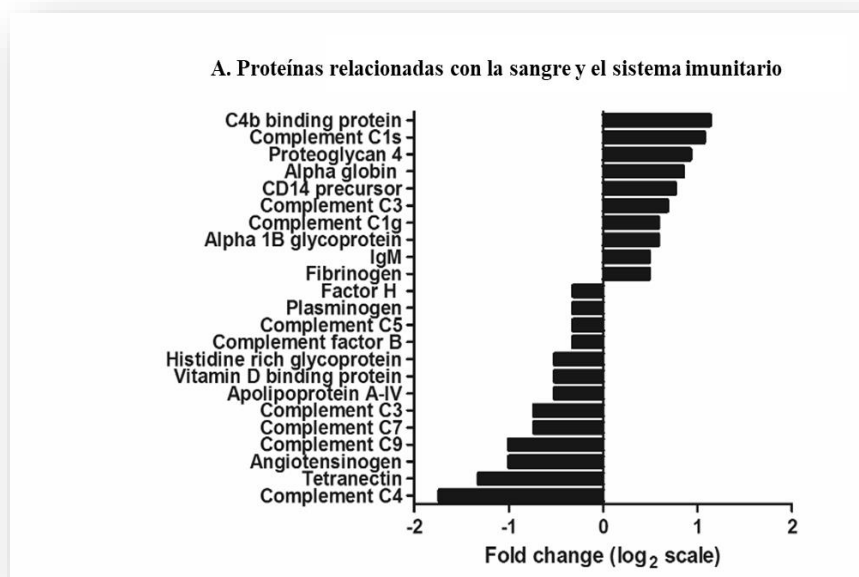


Figura 24. Perfil de expresión en valores normalizados de las proteínas relacionadas con la sangre y el sistema inmunitario. El número de veces (fold change) que las proteínas cambian su proporción en la escala logarítmica en base 2 (log₂ scale) se calculó en base a las diferencias en la concentración de proteína (valores emPAI) entre las muestras de líquido peritoneal de los animales no infectados y de los infectados (18 dpi).

B. Proteínas de adhesión y relacionadas con el ciclo celular

(Figura 25):

Las proteínas estructurales del hígado relacionadas con la matriz extracelular fueron las que mostraron un mayor incremento en el líquido peritoneal de los animales infectados a los 18 dpi comparado con el grupo control no infectado. Entre estas proteínas destacan la periostina, que

aumentó 5,8 veces más en el grupo infectado 18 dpi en comparación con el grupo control no infectado, y siendo éste un cambio estadísticamente significativo ($P < 0,05$). También cabe destacar la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1/*vascular cell adhesion molecule-1*), la cual representa un aumento de 3 veces respecto al grupo no infectado, aunque ésta no represente un cambio estadísticamente significativo a los 18 dpi con comparación con el grupo control no infectado.

La proteína periostina se ha asociado con la presencia de trastornos inflamatorios. En concreto, se ha demostrado que ésta podría desempeñar un importante papel como biomarcador a nivel sistémico de la eosinofilia presente en las vías respiratorias de pacientes asmáticos (Jia y cols., 2012; Liu y cols., 2014). La VCAM-1 es una molécula de adhesión de leucocitos cuya expresión se ha demostrado en células endoteliales estimuladas por citoquinas *in vitro*. Su función parece estar relacionada con la mediación en la infiltración de leucocitos mononucleares a nivel de los vasos y del intersticio (Bacchi y cols., 1993).

En cuanto a las proteínas de este grupo cuya cantidad disminuye en el grupo infectado 18 dpi en comparación con el grupo no infectado, destacan la subunidad de tipo alfa del proteasoma (0,2 veces) ($P < 0,05$) y la proteína NDRG1 (0,3 veces) ($P < 0,01$).

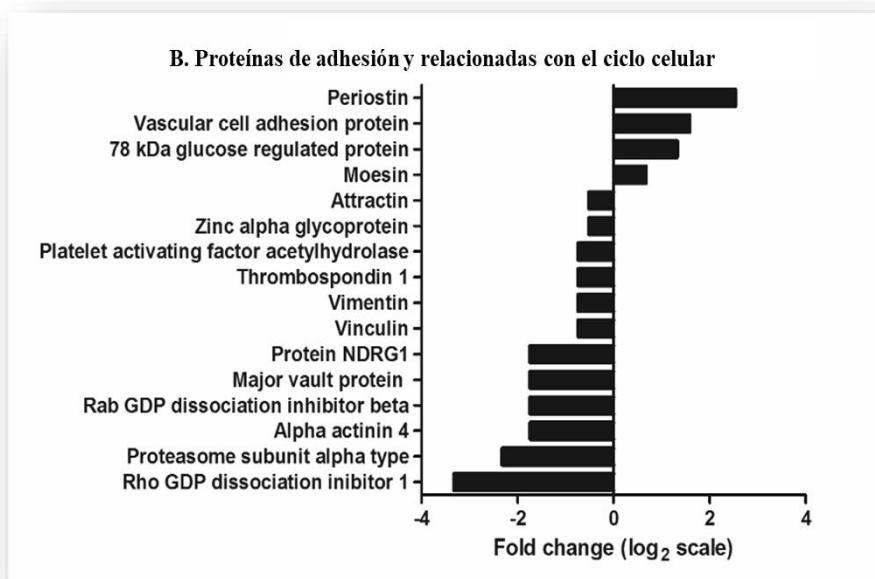


Figura 25. Perfil de expresión en valores normalizados de las proteínas de adhesión y relacionadas con el ciclo celular. El número de veces (fold change) que las proteínas cambian su proporción en la escala logarítmica en base 2 (log₂ scale) se calculó en base a las diferencias en la concentración de proteína (valores emPAI) entre las muestras de líquido peritoneal de los animales no infectados y de los infectados (18 dpi).

C. Proteínas relacionadas con el citoesqueleto y el colágeno

(Figura 26):

En este grupo cabría destacar el aumento en el líquido peritoneal a los 18 dpi de la proteína fibronectina (2,7 veces) y de la proteína de colágeno alfa 1 (VI) (2,5 veces) en comparación con el grupo control no infectado. Con respecto a aquellas que disminuyen, se encuentran la proteína de colágeno alfa 1 (XIV) (0,3 veces) y la proteína lumican (0,4 veces). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

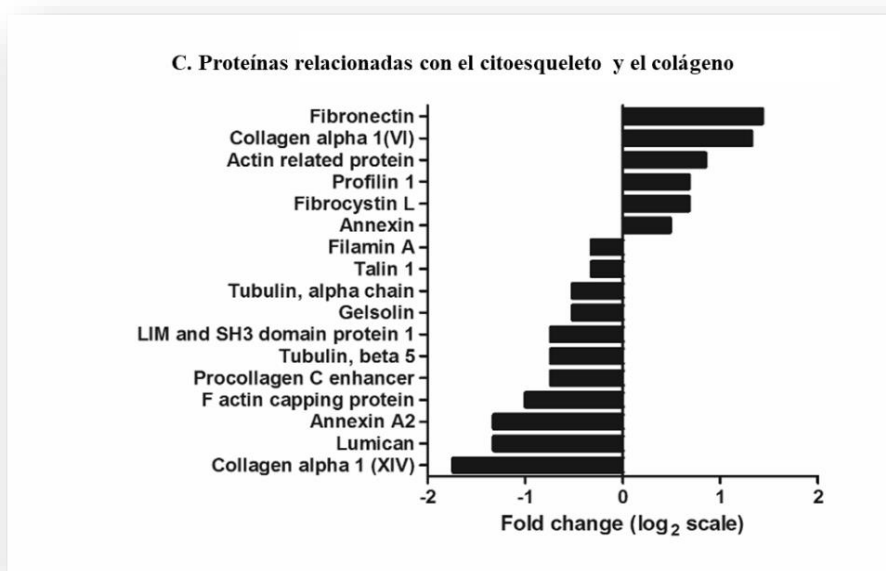


Figura 26. Perfil de expresión en valores normalizados de las proteínas relacionadas con el citoesqueleto y el colágeno. El número de veces (fold change) que las proteínas cambian su proporción en la escala logarítmica en base 2 (log₂ scale) se calculó en base a las diferencias en la concentración de proteína (valores emPAI) entre las muestras de líquido peritoneal de los animales no infectados y de los infectados (18 dpi).

4.3. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DEL HÍGADO.

Para determinar el daño hepático causado por *F. hepatica* en el **experimento 1** en los animales a los 18 dpi en comparación con los animales no infectados, se procedió a la realización de un estudio macroscópico, describiendo las lesiones observadas en la superficie del hígado, e histopatológico, detallando los hallazgos y las alteraciones microscópicas, relacionadas con los estadios tempranos de la infección con *F. hepatica*.

4.3.1. Estudio macroscópico del hígado.

Los hígados procedentes de los animales del grupo control no infectado no presentaron alteraciones macroscópicas en ninguna de sus caras, diafragmática (Figura 27, A), correspondiéndose con imágenes de hígados de oveja normales.

Sin embargo, los hígados de los animales infectados del grupo 18 dpi, presentaban perihepatitis fibrosas con trayectos tortuosos de color blanco-amarillento cuyo tamaño oscilaba entre los 0,2 y los 1,5 cm de longitud, estando localizados principalmente en la cara diafragmática del lóbulo izquierdo del hígado, consistente con las lesiones producidas en las infecciones por *F. hepatica* (Figura 27, B). Además, algunos animales presentaban en el parénquima hepático lesiones puntiformes milimétricas o pequeños trayectos de color rojizo asociadas a hiperemia y hemorragias.

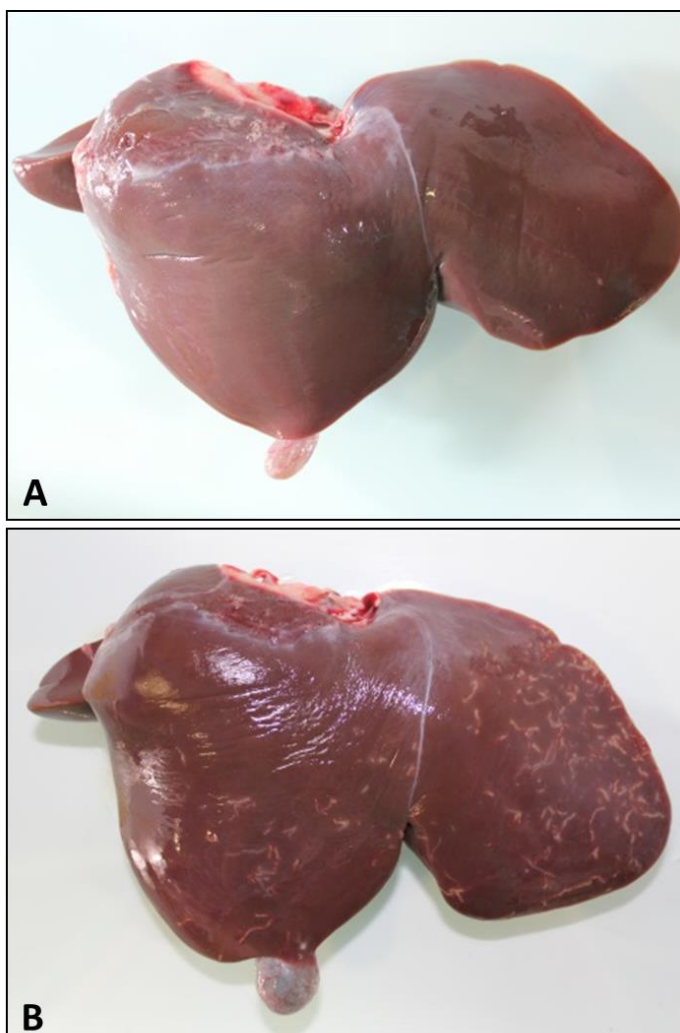


Figura 27. Comparación de los cambios anatomopatológicos en hígado a nivel macroscópico. **(A)** Hígado sin alteraciones macroscópicas de una oveja procedente del grupo NI. **(B)** Hígado de una oveja del grupo infectado 18 dpi que presenta numerosos trayectos parasitarios tortuosos en toda la superficie hepática, con predominio de éstos en el lóbulo izquierdo.

4.3.2. Estudio microscópico del hígado.

Los hígados de las ovejas no infectadas no presentaron lesiones hepáticas en el examen histopatológico (Figura 28, A). Sin embargo, sí presentaron lesiones microscópicas a los 18 dpi, las cuales se caracterizaron por la presencia de focos necróticos y trayectos tortuosos localizados en el parénquima hepático, principalmente a nivel subcapsular. Estas lesiones se producen por el paso de las larvas migrantes a través del parénquima. Asociado a los focos y trayectos necróticos, se encuentra un infiltrado inflamatorio variable, compuesto principalmente por eosinófilos y una mínima cantidad de neutrófilos (<1-2%), así como detritus celulares y hemorragias periféricas. Los espacios porta adyacentes a los focos necróticos mostraron un infiltrado inflamatorio de tipo severo formado principalmente por linfocitos, macrófagos y eosinófilos. Este último hecho sugiere que la vía de entrada de las células inflamatorias al parénquima hepático se realiza a través de las venas portales (Figura 28, B). También se puede apreciar la formación de reacciones granulomatosas en el parénquima hepático de los animales 18 dpi, los cuales se componen por un centro necrótico con infiltrado de eosinófilos, macrófagos dispuestos en empalizada y abundante infiltrado linfoplasmocitario., compuestos por (Figura 28, C y D).

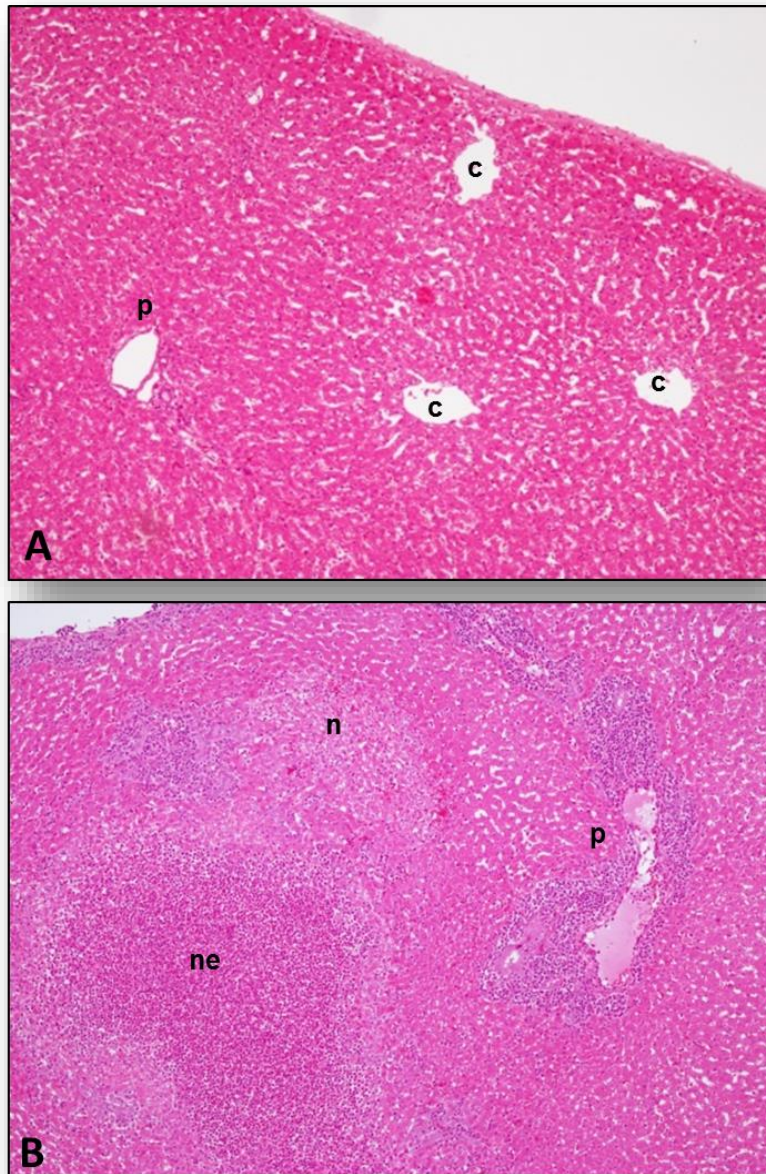


Figura 28 A y B. Cambios anatomopatológicos en hígado a nivel microscópico. **(A)** Sección de hígado de un animal del grupo NI con ausencia de infiltrado inflamatorio; (c) venas centrolobulillares, (p) espacio porta (p) (x40 aumentos). **(B)** Sección de hígado de un animal del grupo infectado 18 dpi en el que se muestra un pequeño foco de necrosis aguda sin infiltrado inflamatorio (n), un foco de necrosis aguda con abundantes células inflamatorias necróticas (ne) y así como un infiltrado inflamatorio severo en los espacios porta (p) adyacentes (x100 aumentos).

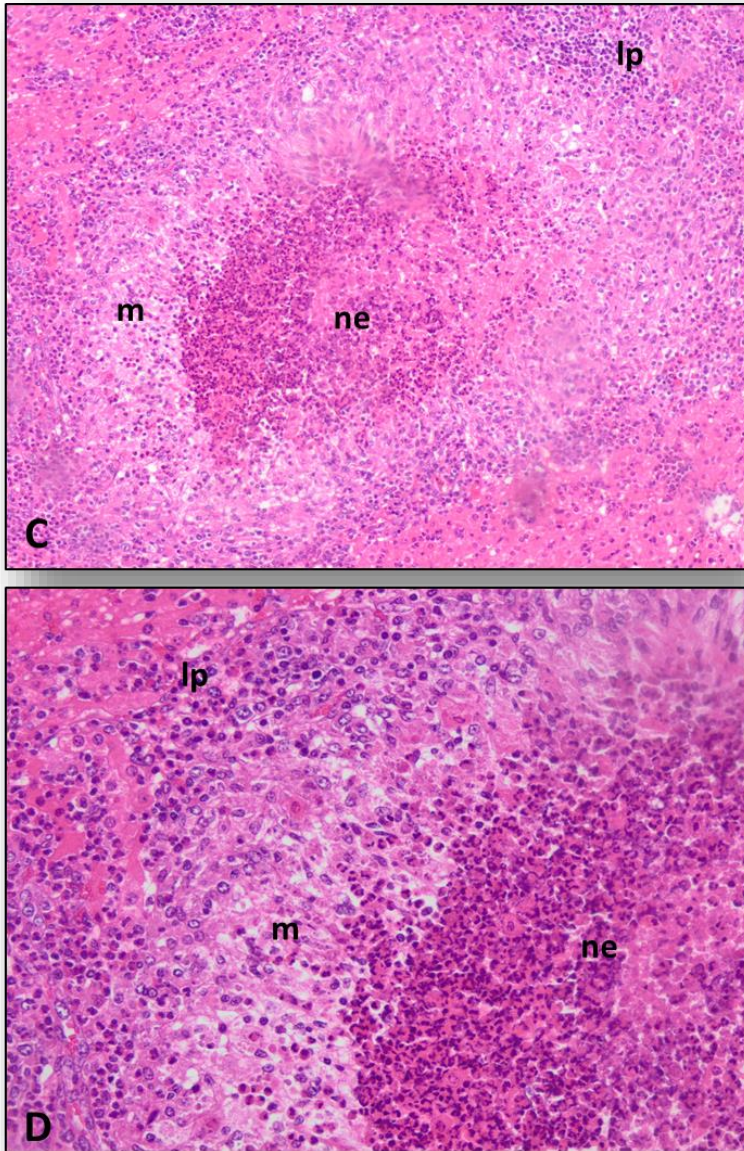


Figura 28 C y D. Detalle de un granuloma hepático de un animal infectado 18 dpi. **(C)** Se observan células necróticas y eosinófilos en el centro (ne), rodeado por macrófagos despuestos en empalizada (m) y un infiltrado linfoplasmocitario (lp) (x100 aumentos). **(D)** Detalle de la Figura 28C (x400 aumentos).

4.4. ANÁLISIS DE ENZIMAS HEPÁTICAS EN SUERO Y EN LÍQUIDO PERITONEAL.

Los resultados del análisis de las enzimas hepáticas en suero de los animales infectados a los 18 dpi fueron consistentes con otros estudios en infecciones con *F. hepatica* en esta fase migratoria, estando los niveles de GLDH aumentados de manera significativa ($P=0,01$) a los 18 dpi en comparación con el grupo control no infectado (Figura 20). Sin embargo, el análisis de las enzimas hepáticas en el líquido peritoneal mostró niveles menores de GLDH en comparación con las obtenidas en el suero, sin mostrar ninguna diferencia significativa entre los animales infectados y no infectados. La enzima GLDH normalmente se relaciona con daño hepático cuando incrementa a nivel plasmático, y se origina a partir de los hepatocitos localizados en el área centrolobulillar del hígado, que la vierten a la circulación, haciéndola más rápidamente detectable en el suero que en el líquido peritoneal. De cualquier modo, aunque los resultados de la GLDH a los 18 dpi aumentaron significativamente, se observaron sólo cuando los datos fueron normalizados debido a la variación individual considerable encontrada entre los animales de un mismo grupo. De esta manera, se sugiere que la determinación de esta enzima sérica podría no ser un marcador fiable en estadios tempranos de la fasciolosis en la oveja.

La enzima GGT, cuya presencia se relaciona con los estadios crónicos de la fasciolosis, ya que está presente en el endotelio biliar, mostró valores muy bajos en suero a los 18 dpi, siendo estos valores similares a los encontrados en el grupo control no infectado (Figura 29).

Los niveles tanto de proteína total, como de albúmina y de globulina, no presentaron diferencias significativas entre los grupos infectado y control no infectado (Figura 29).

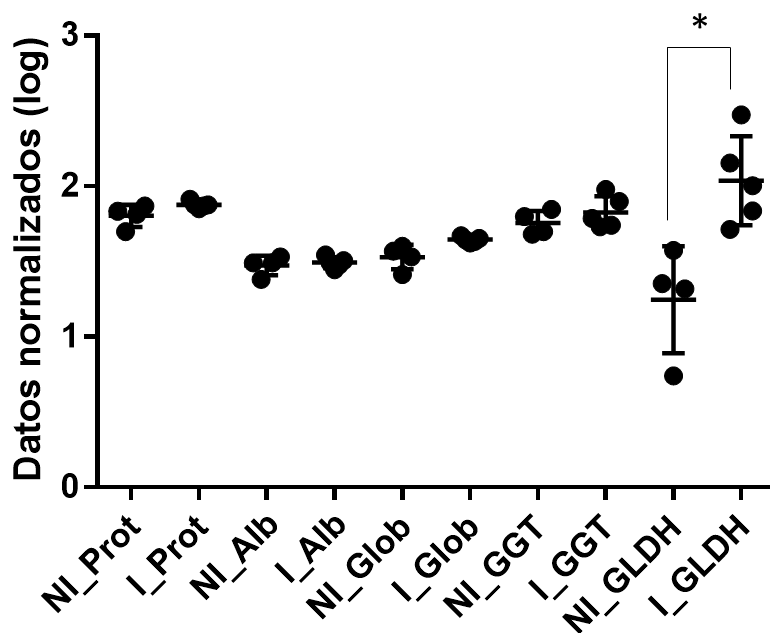


Figura 29. Perfil de enzimas hepáticas séricas. Se muestran los resultados del análisis del suero de ovejas no infectadas (NI) e infectadas (I) frente a una variedad de enzimas hepáticas. Los resultados están representados como la media ($n=5$) de cada grupo \pm DE. Los datos normalizados se muestran mediante un gráfico de puntos en una escala logarítmica. Prot: proteína total (g/l); Alb: albúmina (g/l); Glob: globulina (g/l); GGT: gamma-glutamyl transferasa (unidades/l) y GLDH: glutamato deshidrogenasa (unidades/l). *Valor de $P=0,01$.

4.5. ESTUDIO DE INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA PERIOSTINA Y DE LA VCAM-1 EN EL HÍGADO.

Dado que en el estudio proteómico del líquido peritoneal de los animales del grupo infectado (18 dpi) las cantidades tanto de la proteína periostina como de la VCAM-1 fueron las más elevadas de todas las identificadas, se llevó a cabo la técnica de inmunohistoquímica con el fin de localizar estas proteínas en el hígado ya que, debido a que ninguna de estas proteínas se encuentra de forma natural en el peritoneo, podrían ser potenciales indicadores del daño hepático producido por *F. hepatica*.

Los resultados de la periostina revelaron que su presencia parecía estar confinada al citoplasma de los hepatocitos del parénquima hepático en ambos grupos estudiados (Figura 30, A). Cabría destacar que, alrededor de los focos necróticos presentes en el hígado de los animales del grupo infectado 18 dpi, la expresión de periostina presentaba una mayor intensidad (Figura 30, B y C). Además, un moderado número de células inflamatorias fueron positivas en el área interna de los focos necróticos agudos y dentro del infiltrado inflamatorio agudo asociado a los espacios porta (Figura 30, B y C).

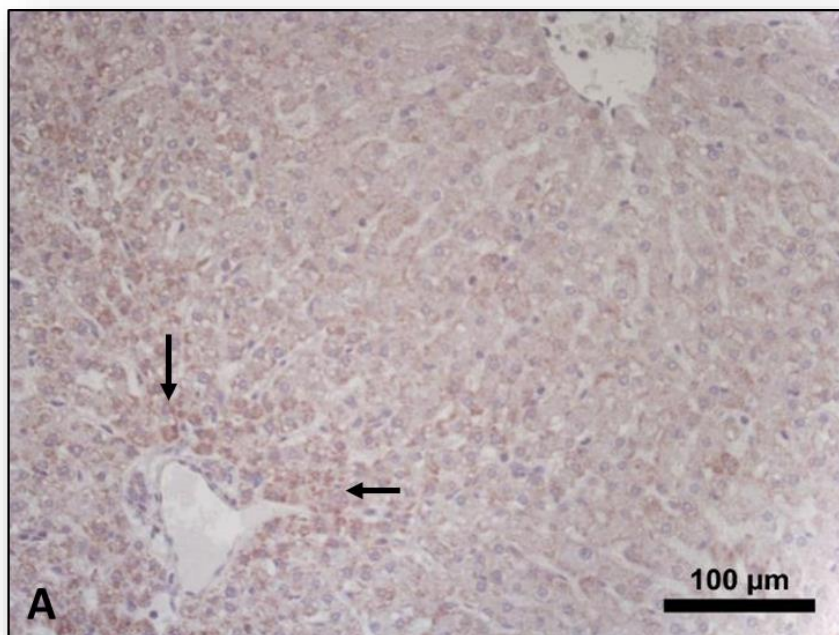


Figura 30, A. Inmunolocalización de la proteína periostina en hígado de animal negativo con positividad localizada en el citoplasma de los hepatocitos, particularmente localizados en áreas perilobulares (flechas).

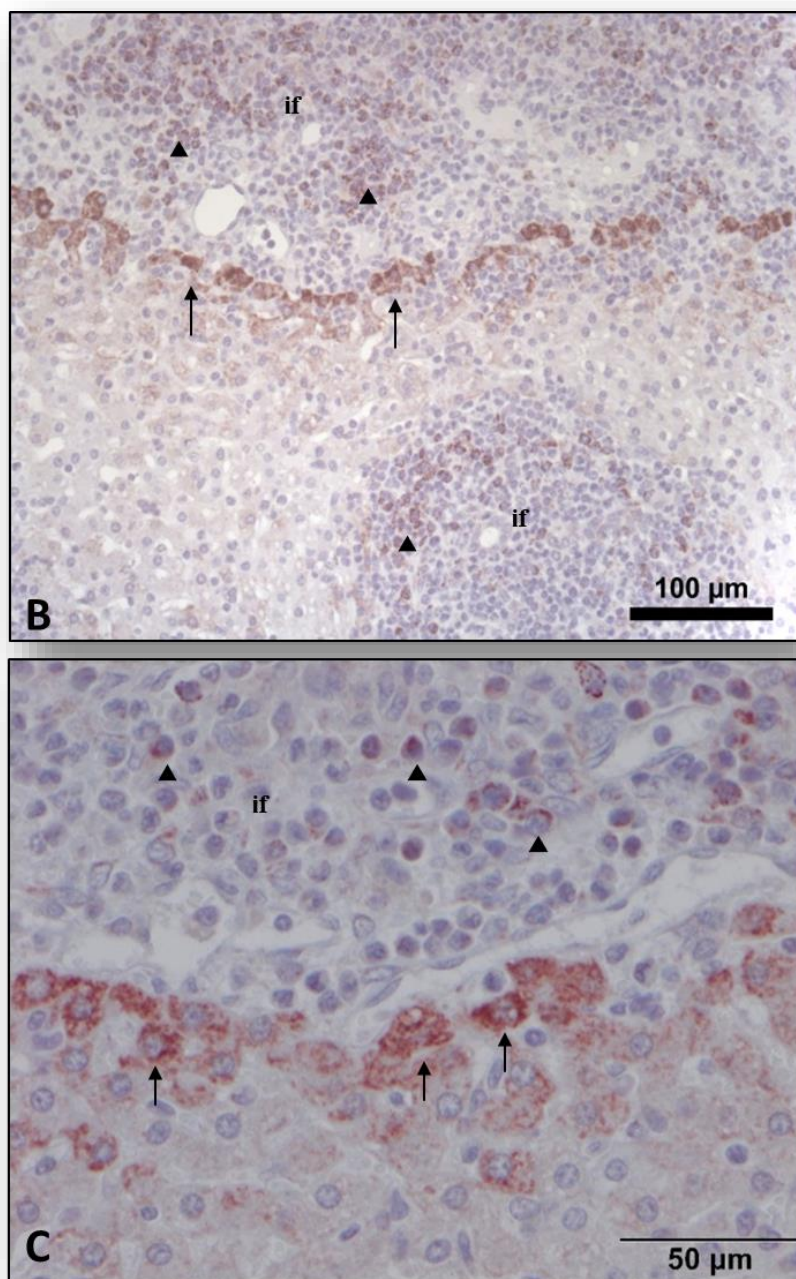


Figura 30, B y C. **(B)** Hígado de animal infectado en el que se observa una positividad intensa en los hepatocitos (flechas) adyacentes a infiltrados inflamaotrios (if) alrededor de los focos necróticos y en células inflamatorias (cabezas de flecha) (100 μm). **(C)** Magnificación de la microfotografía (B) (50 μm).

Por otro lado, los resultados del estudio inmunohistoquímico de los hígados de animales infectados y no infectados frente a VCAM-1 confirmaron la presencia de esta proteína en el hígado de animales infectados. La positividad frente a este anticuerpo estaba principalmente localizada en las células inflamatorias de patrón reticular (morfología compatible con células dendríticas) presentes en áreas de inflamación aguda.

En los hígados de animales negativos, se encontraron células positivas frente a VCAM-1 con morfología de macrófago localizadas principalmente en los espacios porta, aunque de manera escasa (Figura 31, A). Sin embargo, no se encontraron células positivas en los focos necróticos de hígados de animales infectados (Figura 31, B y C). Como se ha detallado en el Apartado 4.2. (B) de Resultados, la VCAM-1 es una molécula de adhesión de leucocitos cuya expresión se ha demostrado en células endoteliales estimuladas por citoquinas *in vitro* cuya función parece estar relacionada con la mediación en la infiltración de leucocitos mononucleares a nivel de los vasos y del intersticio (Bacchi y cols., 1993). Sin embargo, en el presente trabajo no se detectó positividad frente a VCAM-1 en las células endoteliales de ninguno de los dos grupos objeto de estudio.

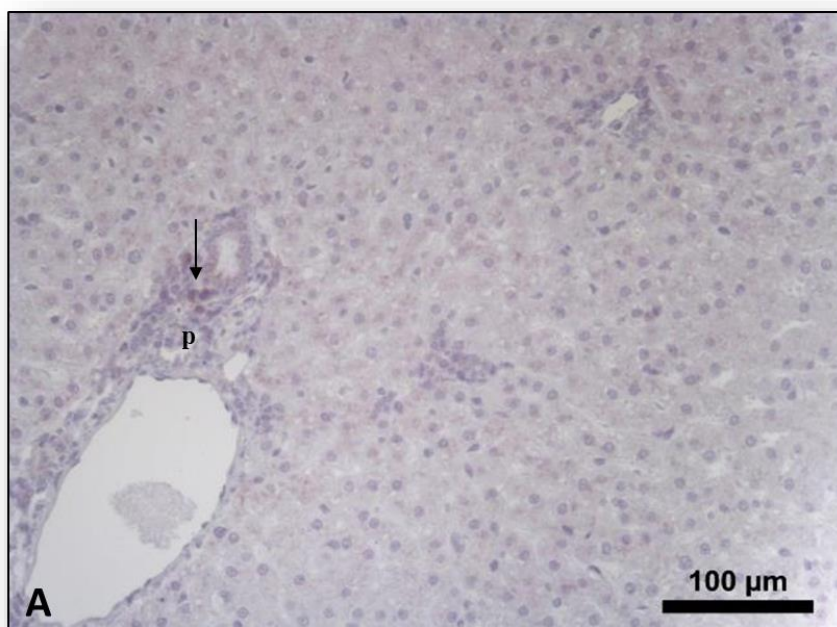


Figura 31, A. Inmunolocalización de la proteína VCAM-1 en Hígado de animal negativo con positividad tenue frente a VCAM-1 en células con morfología de macrófago presentes en los espacios porta (p) (100 μm).

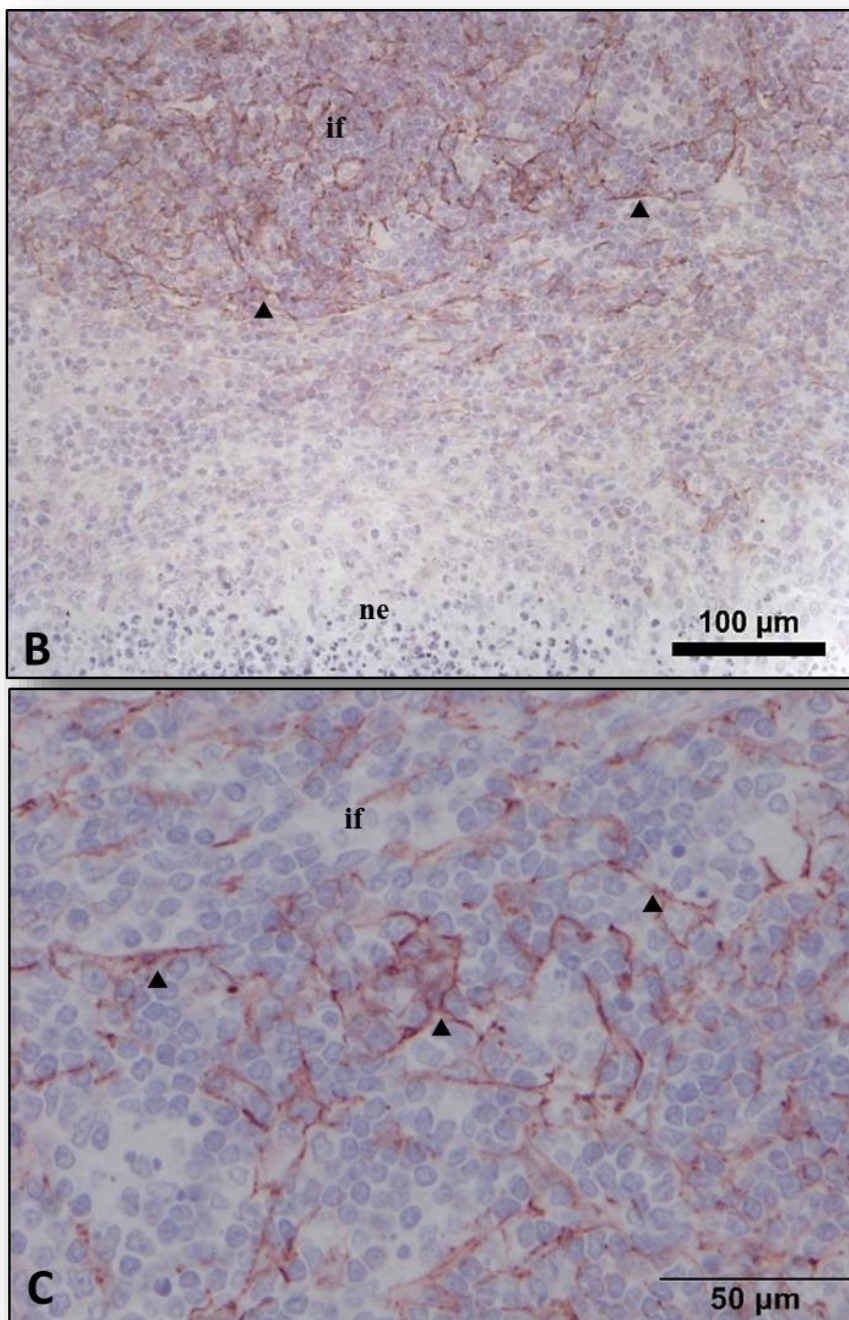


Figura 31, B y C. **(B)** Inmunorreacción de elevada intensidad frente a VCAM-1 en hígado de animal infectado, estando particularmente localizado en los infiltrados inflamatorios (if) y en células que muestran un patrón reticular (cabeza de flechas) y ausente en los focos necróticos agudos (ne) (100 μm). **(C)** Magnificación de la microfotografía (B) (50 μm).

5. DISCUSIÓN

La fasciolosis se encuentra actualmente en objeto de estudio con la finalidad principal de encontrar una vacuna eficaz para solventar los problemas que han surgido en la lucha contra esta enfermedad.. La llegada de los parásitos al hígado implica el rápido crecimiento de estos y el desarrollo de su aparato digestivo, así como una serie de alteraciones metabólicas y una marcada regulación de la expresión de más de 8000 genes (Cwiklinski y cols., 2015). Estudios sobre la infección por *F. hepatica* en ratón (Donnelly y cols., 2005; Donnelly y cols., 2008) y en rumiantes (Mulcahy y cols., 1998; Mulcahy y cols., 1999; Walsh y cols., 2009; Flynn y cols., 2010) describen que la respuesta inmunitaria en la infección por *F. hepatica* se encuentra dominada por una de tipo Th2. Sin embargo, la mayoría de los estudios en rumiantes han ido encaminados en el examen de la infección en estadios crónicos, cuando el parásito ya se ha desarrollado considerablemente y el daño tisular en el hospedador ha tenido lugar (Mulcahy y cols., 1998; Mulcahy y cols., 1999; Walsh y cols., 2009). Por todo esto, las fases iniciales de la infección con *F. hepatica*, en la que tienen lugar la penetración de la pared intestinal y la migración a través del compartimento peritoneal hacia el hígado por parte de las formas juveniles de este parásito, juegan un papel crítico en el establecimiento del proceso de infección en el hospedador mamífero (Van Milligen y cols., 1999). El presente estudio es el primero en investigar la respuesta inmunitaria temprana en el compartimento peritoneal del hospedador en fases tempranas de la infección.

Desde el punto de vista del hospedador, la penetración y migración a través del hígado provoca una patología muy grave como resultado de una intensa respuesta inflamatoria a los antígenos secretados por *F. hepatica*

(principalmente proteasas), además de daño tisular. La prevención tanto del proceso inflamatorio como del daño tisular a nivel hepático es el principal objetivo del estudio de las nuevas estrategias de control frente a la fasciolosis. Sin embargo, el tratamiento con triclabendazol parece ser el único efectivo frente a las fases larvarias de parásito, de ahí que siga siendo el tratamiento de elección y más eficaz escogido por los ganaderos. Tanto es así, que los parásitos han evolucionado para presentar resistencia frente a este fármaco, dando lugar a la escasez de medios de prevención eficaces frente a las fases tempranas y agudas de esta enfermedad parasitaria y produciéndose, de manera paulatina, un aumento de la prevalencia de esta enfermedad en Europa (Brennan y cols., 2007; Toet y cols., 2014., Molina-Hernández y cols., 2015).

El presente estudio se ha basado principalmente en el análisis de líquido peritoneal de ovejas tanto infectadas como no infectadas con *F. hepatica* en fases tempranas de esta infección, con el objetivo de profundizar en el conocimiento acerca de la respuesta que el hospedador desarrolla frente a la migración de las formas juveniles (NEJS) hacia el hígado; particularmente en el compartimento peritoneal, y en pos de poder desarrollar una vacuna efectiva frente a *F. hepatica* que actúe durante estas fases tempranas de la infección, para prevenir la penetración, migración y el establecimiento definitivo del parásito en el hígado.

5.1. Contajes absoluto y diferencial de los leucocitos peritoneales.

Los resultados obtenidos del estudio de las poblaciones celulares inmunocompetentes que están presentes en el líquido peritoneal a lo largo de la infección con *F. hepatica* en ovejas presentaron un marcado aumento significativo en el número total de leucocitos a los 9 y 18 dpi en los dos experimentos realizados. Estos resultados indican que el comienzo del reclutamiento leucocitario activo hacia la cavidad abdominal en estadios tempranos de la infección comienza a partir de los 9 dpi, cuando las formas juveniles (NEJs) de *F. hepatica*, tras penetrar la pared del intestino, migran a través del compartimento peritoneal en su camino hacia el hígado donde se establecerán las formas adultas.

Las diferencias observadas entre ambos experimentos entre las que se encuentran el descenso significativo en los leucocitos a los 1 y 3 dpi observado en el **experimento 1**, hecho que no se observó en el **experimento 2**, además del considerable menor aumento de leucocitos a los 9 y 18 dpi encontrado en el **experimento 1** en comparación con el **experimento 2**, podría deberse al uso de dos anticoagulantes distintos en la toma de muestras del líquido peritoneal. Así, en el **experimento 1** se usó heparina, mientras que en el experimento 2 se usó EDTA, lo que podría haber propiciado la coagulación parcial de la sangre y la consiguiente formación de coágulos de fibrina en los que quedaron atrapadas las células leucocitarias reflejándose en la reducción en el conteo de leucocitos a lo largo de la infección en el **experimento 1** respecto a lo obtenido en el **experimento 2**.

Otro hecho que pudo influir en la reducción del número de leucocitos encontrada en el **experimento 1** a los 1 y 3 dpi son los fenómenos de

apoptosis, ya que se ha descrito la capacidad de *F. hepatica* de inducir la apoptosis de leucocitos peritoneales en distintas especies como la oveja (Escamilla y cols., 2017) y la rata (Guasconi y cols., 2012). La ausencia de disminución de las leucocitos peritoneales en **el experimento 2**, indica que la posible pérdida de leucocitos por apoptosis sería compensada con el reclutamiento activo de leucocitos al compartimento peritoneal.

Cuando estudiamos las composición celular del líquido peritoneal encontramos un paralelismo entre ambos experimentos de manera que, al principio de la infección, entorno a los 1 y 3 dpi, los leucocitos peritoneales estaban constituidas principalmente por macrófagos y, en menor medida, linfocitos, con presencia muy ocasional de eosinófilos. Sin embargo, a los 9 y 18 dpi destaca el marcado aumento del número de eosinófilos en el compartimento peritoneal en detrimento de los macrófagos principalmente a los 9 dpi y de los macrófagos y linfocitos a los 18 dpi. El descenso relativo de linfocitos y sobre todo macrófagos a los 9 y 18 dpi, también fue descrito en estudios previos (Zafra y cols., 2013; Escamilla y cols., 2017) y se debió al marcado incremento de los eosinófilos. Al tener en cuenta el conteo diferencial y absoluto para cada población celular se observó un incremento significativo tanto de los linfocitos como de los macrófagos a los 9 y 18 dpi en el **experimento 2**, y a los 18 dpi en el **experimento 1**, lo que indica que el reclutamiento activo de estas poblaciones celulares es mayor que los fenómenos de muerte celular por apoptosis. Este es el primer estudio en el que se realiza una evaluación de la cantidad total de leucocitos peritoneales en rumiantes en etapas tempranas de la infección con *F. hepatica*. El aumento de eosinófilos en el líquido peritoneal en fases tempranas de infecciones con *F. hepatica* ha sido descrito por nuestro grupo en distintos

estudios en rumiantes tales como la cabra (Zafra y cols., 2013 a) y la oveja (Escamilla y cols., 2017), así como por otros grupos en modelo murino (Sibille y cols., 2004).

Este escenario en el que existe una marcada eosinofilia es típico de infecciones por helmintos que promueven la existencia de repuestas inmunitarias de tipo Th2 la cual, en algunos casos, como en infecciones primarias por filarias (Cadman y cols., 2014) y en la schistosomiasis (Davies y cols., 2005; Reimert y cols., 2006) está asociada con una significativa protección inmunitaria por parte del hospedador. Sin embargo, el papel de los eosinófilos en las respuestas inmunitarias frente a la infección y su función antiparasitaria directa se encuentra actualmente en objeto de debate. Estudios que han utilizado ratones deficientes en eosinófilos y que han sido sometidos a infección con *Schistosoma mansoni* y *Nippostrongylus brasiliensis* han demostrado que la presencia de eosinófilos en elevados niveles podría jugar un papel en la remodelación tisular antes que ser agentes causantes del daño directo en el parásito (Hogan y cols., 2008). En el trabajo llevado a cabo por Ohnmacht y colaboradores (2007), ratones sometidos a infección con el parásito con *Nippostrongylus brasiliensis* presentaron una marcada eosinofilia nivel de los tejidos; sin embargo, la tasa de producción de eosinófilos en lugares como el peritoneo se mantiene constante, hecho que podría indicar que la presencia de éstos a este nivel se deba principalmente a una mayor supervivencia de eosinófilos ya existentes en lugar de una mayor producción por parte de la médula ósea, sugiriendo así que la cavidad peritoneal podría represenar un reservorio de eosinófilos durante las infecciones por helmintos. En el caso de infecciones por *F. gigantica* en ovejas de Indonesia de cola corta, resistentes a dicho parásito,

se ha demostrado que los eosinófilos y macrófagos peritoneales pueden matar larvas recién desenquistadas de esta especie de fasciola en presencia de suero de animales infectados, hecho que no ocurre en el caso de *F. hepatica* a la que son susceptibles esta raza ovina (Piedrafita y cols., 20017), por tanto, en respuestas protectoras sí parece que los eosinófilos peritoneales juegan un papel importante, aunque su presencia no indica que su respuesta sea siempre protectora, como ocurrió en las dos experiencias de nuestro estudio.

5.2. Inmunofenotipo de los macrófagos y células dendríticas peritoneales.

Para conocer de forma más detallada las poblaciones celulares presentes en el líquido peritoneal nos propusimos estudiar el inmunofenotipado mediante inmunocitoquímica. De esta forma, se usaron anticuerpos anti-CD68, anti-CD14, anti-iNOS, anti-CD206, anti-CD83 y anti-MHC-II, los cuales son marcadores de superficie de macrófagos, células presentadoras de antígenos y células dendríticas dado que los macrófagos son células que juegan un papel crucial respuesta inmunitaria innata y adaptativa (Simmons y cols., 1989; Zhou y cols., 1992; Ulevitch y cols., 1995; Barclay y cols., 1997; Underhill y Ozinsky, 2002; Valheim y cols., 2004; Kurt y cols., 2014; Zhou y cols., 2014;; Ampem y cols., 2016).

Así, el marcador CD68 se ha descrito como una glicoproteína perteneciente a un grupo de receptores “scavengers” o barredores, que participan en la respuesta inmunitaria innata frente a infecciones y que se expresa en monocitos y en macrófagos tisulares, cuya función es promocionar la fagocitosis y mediar el reclutamiento y activación de los

macrófagos (Gordon y cols., 2014). Además se ha postulado que la expresión de este marcador es elevada en los macrófagos peritoneales de manera basal (Laskin y cols., 2001). En el trabajo llevado a cabo por Valheim y colaboradores (2004), se relaciona la expresión de este marcador CD68 con una elevada presencia de lisosomas y con una alta actividad fosfatasa ácida en los macrófagos presentes en granulomas paratuberculosos en cabras, además de encontrarse esta población de macrófagos CD68+ asociada con células T CD4+, lo que les confiere un posible papel como mediadores en la respuesta inmunitaria adaptativa.

En nuestro trabajo, el marcador CD68 se expresó en células grandes, de morfología redondeada, con citoplasma amplio y basófilo tenue y con núcleo basófilo, frecuentemente con forma arriñonada, morfología compatible con la de los macrófagos. Todos los macrófagos peritoneales estudiados mediante inmunocitoquímica a lo largo de la infección tanto en el **experimento 1** como en el **experimento 2** expresaron positividad frente a este anticuerpo, confirmándose como un buen marcador de macrófagos, como ha sido descrito en estudios previos en rumiantes incluyendo la oveja (Herder y cols., 2013).

Por otro lado, la glicoproteína de membrana de los macrófagos CD14 se ha descrito como un receptor “multifuncional” que tiene un papel dentro de la respuesta inmunitaria innata como receptor de componentes infecciosos externos (lipopolisacáridos bacterianos) y promotor, por tanto, de respuestas de tipo inflamatorio (Pugin y cols., 1994; Ulevitch y Tobias, 1995), así como un papel dentro del reconocimiento y eliminación de células apoptóticas propias (Devitt y cols., 1998). Estudios recientes han sugerido

que la interacción entre el receptor CD14 y las células apoptóticas suprimen señales proinflamatorias (Voll y cols., 1997; Fadok y cols., 1998).

Además, se ha publicado que el CD14 aumenta en macrófagos del hígado de ratones en la infección por el helminto *Schistosoma mansoni* (Tundup y cols., 2014). También se ha descrito el aumento en la expresión de este marcador en monocitos circulantes de bovinos infectados con *F. hepatica*, donde se describe una menor recuperación y captación de micobacterias de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) por parte de macrófagos derivados de monocitos sanguíneos (PBMCs) cuando existe una coinfección en bovino de *M. bovis* y *F. hepatica*. Sin embargo, a pesar de esta aparente disminución en la capacidad fagocítica de los macrófagos en este escenario, la expresión de CD14 en estos macrófagos se encontraba aumentada (Garza-Cuartero y cols., 2016). La explicación para esta reducción tanto en la capacidad fagocítica como de captación de los macrófagos podría estar en que los macrófagos estarían activados de manera alternativa, lo cual se ha descrito en la infección por *F. hepatica* (Flynn y cols., 2007; Golden y cols., 2010), presentando estos macrófagos una ineficiencia en la fagocitosis de bacterias comparado a si estuvieran activados de manera clásica. El presente trabajo es el primero en caracterizar la expresión de CD14 en leucocitos peritoneales en rumiantes infectados con *F. hepatica*, el cual reveló un incremento significativo a los 3, 9 y 18 dpi con respecto al grupo control no infectado en ambos experimentos. Estos resultados coinciden con el incremento en la expresión de CD14 en monocitos sanguíneos de bovinos infectados con *F. hepatica* y *M. bovis* (Garza-Cuartero y cols., 2016) y en macrófagos hepáticos de ratones infectados con *S. mansoni* (Tundup y cols., 2014). El hecho de que aumente la expresión de CD14 en estos días, junto

con la polarización temprana hacia un perfil M2 de los macrófagos, también descrito en este estudio y que se discute posteriormente, sugiere que, aunque los macrófagos tienen capacidad fagocítica, no son capaces de promover una respuesta eficaz. Además, el hecho de que las formas juveniles del parásito se encuentren migrando a través del intestino y del peritoneo en estas fases tempranas, podría explicar la relación con la actividad fibroblástica y de cicatrización. En este sentido se ha sugerido que los monocitos pertenecientes a la subclase CD14⁺⁺CD16⁺ presentan morfológicamente características de macrófagos, además de actividad fagocítica y características relacionadas con la angiogénesis (Mandl y cols., 2014). La expresión de CD14 también se ha relacionado con proliferación fibroblástica (Liao y cols., 2010) estando los macrófagos que expresan este marcador relacionados con procesos de cicatrización caracterizados por la formación de un tejido cicatricial exagerado (queloide) y que, además, presentan una polarización hacia un perfil M2 (Jin y cols., 2018).

El receptor de manosa o CD206 forma parte de la familia de receptores de lectina y son proteínas transmembrana que poseen dominios estructurales y funcionalmente relacionados con el reconocimiento de azúcares (manosa) en su porción extracelular. La expresión de CD206 puede ser regulada por citoquinas del tipo Th1 como IFN- γ , que inhibe su expresión (Kiefer y cols., 1998), así como por citoquinas de tipo Th2, como la IL-4, que induce su expresión (Akagawa y cols., 2006; Randolph y cols., 2008).

La expresión del receptor de manosa o CD206 en los macrófagos es un indicador de activación alternativa (Ampem y cols., 2016; Nawaz y cols., 2017). Se ha demostrado que la expresión de este marcador aumenta en los

macrófagos de ratones coinfectados con *Taenia crassiceps* y dos especies diferentes de *Leishmania* (Rodríguez-Sosa y cols., 2006). Sin embargo, la mayoría de los estudios basados en el análisis de macrófagos activados de manera alternativa en la infección por *F. hepatica* se han centrado en la detección de los niveles de arginasa *in vitro* (Guasconi y cols., 2011; Haçariz y cols., 2011; Luo y cols., 2011; Figueroa-Santiago y Espino, 2014).

En la presente Tesis Doctoral se analiza mediante inmunocitoquímica la expresión del marcador CD206 en la superficie de macrófagos peritoneales de animales infectados y no infectados con *F. hepatica*. Los resultados demuestran un incremento en la expresión y en la intensidad de inmunorreacción de este marcador en los macrófagos peritoneales en animales desde 1 dpi y que se mantiene durante el transcurso de infección en comparación con el grupo control no infectado. En un estudio llevado a cabo por Paveley y colaboradores (2011), se describe que el receptor de manosa CD206 podría tener un papel muy importante en la mediación de la internalización de las moléculas glicosiladas de *Schistosoma mansoni* en su forma larvaria durante el proceso crítico de la infección del hospedador.

Por otra parte, la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) produce óxido nítrico en respuesta a estímulos proinflamatorios y está asociada con la activación clásica de los macrófagos (MacMicking y cols., 1995). Aunque el nivel de expresión de iNOS en nuestro estudio aumentó de manera significativa a los 3 dpi en el **experimento 1** y a los 9 dpi en el **experimento 2**, no existen diferencias significativas en el resto de dpi respecto al grupo control negativo y, además, la intensidad de tinción que se observó en estas células fue débil, denotando una baja expresión de este

marcador en los macrófagos del líquido peritoneal en estadios tempranos de la infección con *F. hepatica*. Estos resultados coinciden con los de un estudio en el modelo murino en el que se constataron bajos niveles en la expresión génica de iNOS en el grupo control no infectado y a los 1, 7, 14 y 21 días después de la infección con *F. hepatica* (Donnelly y cols., 2005). En el caso de la oveja, se ha publicado un marcado descenso en la transcripción de iNOS en PBMCs de ovejas a los 7 dpi (Fu y cols., 2016). Este último dato contrasta con los obtenidos en nuestro estudio, en el que existe poca variación en la expresión de iNOS durante el transcurso de la infección. Estos datos sugieren que puede haber diferencias tanto la expresión génica como en la síntesis proteica de iNOS, pudiendo permanecer la proteína relacionada con la expresión de iNOS activa durante más tiempo que lo que lo está su expresión génica. Estas diferencias también podrían ser debidas a la diferente expresión de iNOS en PBMCs y en macrófagos peritoneales.

Los resultados de la ratio iNOS/CD206 también sugieren que existe una polarización hacia un fenotipo M2 de los macrófagos peritoneales desde 1 dpi, hecho que es consistente con estudios previos llevados a cabo en ratón (Donnelly y cols., 2005), y en PBMCs de oveja (Fu y cols., 2016) y de bovino (Flynn y cols., 2007). Este es el primer estudio en el que se demuestra la activación alternativa de los macrófagos en el líquido peritoneal de la oveja *in vivo*. Como se ha descrito previamente, los macrófagos M2 son células que promueven respuestas de tipo Th2 y que se caracterizan por su baja producción en citoquinas proinflamatorias (IL1 β e IL12) y elevada producción de citoquinas anti-inflamatorias (IL10) (Gordon y Martínez, 2010; Murray y Wynn, 2011). Particularmente, los macrófagos M2 juegan un papel principal en la resolución de la inflamación, remodelación tisular

y en la reparación de heridas mediante la liberación de IL10, secretando factores tróficos y promoviendo la eliminación de las células apoptóticas (Gordon y Martínez, 2010; Murray y Wynn, 2011). De manera contraria, los macrófagos M1 proinflamatorios son típicamente estimulados durante la fase aguda de la inflamación en respuesta a la citoquina IFN- γ o a ésta combinada con estímulos de origen microbiano o de otras citoquinas (por ejemplo, del TNF- α), siendo eficientes en la fagocitosis de bacterias, al contrario que los macrófagos M2 (Mosser y Edwards, 2008).

En las infecciones por helmintos, los macrófagos tienden a polarizarse para expresar el fenotipo M2 que, como se ha descrito, está implicado en la regulación del ambiente de citoquinas. Este cambio induce la respuesta inmunitaria de tipo Th2, que es inefectiva en controlar la infección por *F. hepatica* y resulta en una enfermedad crónica (O'Neill y cols., 2000; Kreider y cols., 2007) aunque, en el caso de los nematodos, la respuesta Th2 y la activación alternativa de los macrófagos se han descrito como efectivas en la eliminación de este tipo de parásitos (Anthony y cols., 2006). Mientras que se piensa que la respuesta del hospedador frente a *F. hepatica* es más efectiva durante el estadio intestinal y peritoneal y las fases tempranas de migración a través del hígado (Van Milligen y cols., 1999), la rápida polarización hacia M2 de los macrófagos encontrados en la cavidad peritoneal de la oveja infectada con *F. hepatica* en este estudio podría estar indicando un mecanismo de modulación que podría estar facilitando la supervivencia del parásito en el hospedador durante las fases tempranas de la infección.

Se ha descrito que el reclutamiento de macrófagos M2 en el trasplante de células epiteliales ovinas procedentes del líquido amniótico en lesiones de

tendón inducidas experimentalmente son capaces de estimular la regeneración tisular. Sin embargo, a los 7 días después de realizar el trasplante de estas células se observó la presencia de una subpoblación de macrófagos M1, sugiriendo un estado inflamatorio, pero a partir del día 14, se redujeron el número de estas y se promovieron los macrófagos M2 anti-inflamatorios y regenerativos. (Mauro y cols., 2016). En infecciones por *F. hepatica* los macrófagos M2 también podrían jugar un papel en procesos regenerativos y de cicatrización, aunque esto podría ocurrir en las lesiones hepáticas y en fases más avanzadas de la infección. Las lesiones peritoneales causadas por la migración de *F. hepatica* son prácticamente imperceptibles, por tanto, la activación alternativa de los macrófagos peritoneales encontrada en el presente estudio estaría más relacionada con la modulación de la respuesta inmunitaria inducida por el parásito para facilitar su supervivencia que con procesos de cicatrización en la que los macrófagos peritoneales tengan un papel destacado.

La expresión de la molécula CD83 en células dendríticas maduras podría estar relacionada con una función especializada durante la presentación antigénica, contribuyendo así con la activación linfoide y actuando como una molécula de adhesión (Scholler y cols., 2001). Sin embargo, parece ser que también expresan esta molécula los linfocitos B y T activados y la expresión tanto en éstos como en células dendríticas podría estar relacionada con la modulación de la respuesta inmunitaria por medio de la activación de las CDs y la liberación de señales co-estimuladoras para la estimulación linfocitos T naïve y de memoria, respectivamente (Aerts-Toegaert y cols., 2007).

Se ha descrito que la exposición a helmintos produce modificaciones en las CDs, las cuales producen una polarización hacia una respuesta inmunitaria de tipo Th2 (Pulendran y cols., 2010; Briseño y cols., 2014). En algunos casos, estas modificaciones de las CDs se han relacionado con una incapacidad por parte de éstas para expresar marcadores propios de un estado de maduración o activado cuando se exponen a determinados helmintos.

En la presente Tesis Doctoral se describe por primera vez la expresión de CD83 en leucocitos peritoneales de ovejas infectadas con *F. hepatica*. Nuestros resultados, juntos con los de la bibliografía, nos sugieren que la expresión de este marcador depende de diversos factores, como el helminto al que se expone, el origen de las CDs y la especie a la que pertenece el hospedador. En cualquier caso, nuestros resultados con respecto al marcador CD83 sugieren que existe un incremento significativo del porcentaje de CDs peritoneales positivas frente a CD83 en animales a los 1, 3, 9 y 18 dpi con respecto al grupo control no infectado en el **experimento 1**. Estos resultados no se confirmaron en el **experimento 2**, en el que no hubo diferencias significativas en ningún punto de la infección respecto al grupo control no infectado. Estas diferencias podrían estar motivadas por el diferente protocolo usado en ambos experimentos para la obtención de los leucocitos peritoneales. En cualquier caso, en nuestro estudio no se ha podido constatar el descenso en la expresión de marcadores de maduración de CDs descrito en modelos murinos (Hamilton y cols., 2009) y el descenso en la expresión de CD83 en CDs derivadas de monocitos humanos expuestas a *A. pegreffii* (Napoletano y cols. 2018), *T. multiceps* (Terrazas y cols., 2011) y *T. spiralis* (Aranzamendi y cols., 2012). Sin embargo, aunque en un

estudio llevado a cabo por van der Kleij y cols (2002), la exposición de CDs humanas a productos de *S. mansoni* puede aumentar la expresión del marcador CD83, éstos podrían ser inefectivos en promover la expresión de otros marcadores de maduración de CDs. Se necesitarían más estudios para determinar qué marcadores específicos son los que tendrían que expresarse en las CDs para considerar un fenotipo de CDs como maduro.

Con respecto a los resultados obtenidos en nuestros estudio respecto a la expresión de MHC-II en leucocitos peritoneales, se observó un incremento en la expresión de este marcador desde el 1 dpi y que se mantenía durante el transcurso de la infección en el experimento 1 en comparación con el grupo control no infectado. Sin embargo, este resultado no se confirmó en el experimento 2 observándose, además, una elevada variabilidad individual en los resultados de los animales de cada grupo frente a este marcador de superficie celular.

El presente estudio es el primero en el que se analiza la expresión de expresión de MHC-II en leucocitos peritoneales. Existe evidencia de que los componentes de *F. hepatica* pueden modular la maduración y función de las CDs *in vitro* (Dowling y cols., 2010; Falcón y cols., 2010; Everts y cols., 2012; Vukman y cols., 2013) y se ha descrito que las CDs de ratón infectado con *F. hepatica* presentan un fenotipo semi-maduro que se caracteriza por la baja expresión de MHC-II y CD40 y por la alta secreción de la citoquina inmunorreguladora IL-10 (Rodríguez y cols., 2015).

El estudio llevado a cabo por Mota Lopes y colaboradores (2014), demostró que la expresión de marcadores de superficie relacionadas con la maduración de las CDs (MHC-II, CD83) en CDs derivadas de monocitos

estimuladas en cultivo con el antígeno Sm29 de *S. mansoni*, aumenta en los cultivos estimulados con Sm29 en comparación con los cultivos celulares no estimulados. También ha sido descrito por Noya y colaboradores (2014, 2017) que el péptido tipo mucina de *F. hepatica* (Fhmuc), el cual se encuentra expresado de forma elevada en los NEJs, favorece el reclutamiento de células MHC-II⁺ hacia la cavidad peritoneal cuando se administran intraperitonealmente CDs derivadas de médula ósea y estimuladas con Fhmuc y LPS en ratón.

Se ha observado una parcial sobreexpresión de algunos marcadores asociados con la maduración cuando se exponen a los ES del nematodo *N. brasiliensis*, donde marcadores como CD86 y CD40 estaban sobreexpresados, pero no CD80 ni MHC-II (Balic y cols., 2004). De manera similar, algunos productos liberados por las larvas de *Schistosoma* pueden aumentar la expresión de MHC-II, CD40 Y CD86, pero a un nivel inferior que como se desencadenaría con un estímulo de tipo Th1 (Jenkins y Mountford, 2005). También se ha descubierto que cuando se incuban CDs derivadas de médula ósea con una glicoproteína filarial, el resultado es la sobreexpresión de algunos marcadores de maduración, pero también en menor grado que si se tuviera un estímulo de tipo Th1 (Whelan y cols., 2000). Por todo esto, las CDs asociadas con una respuesta Th2 no llegan a adquirir un estado totalmente activado, aunque algunos marcadores de maduración estén sobreexpresados (van Riet y cols., 2007).

5.3. Respuesta inmunitaria humoral y expresión de citoquinas en líquido peritoneal.

Para conocer la respuesta inmunitaria humoral local en el compartimento peritoneal se utilizaron una combinación de técnicas como son el inmunoblotting y el ELISA, evaluando los niveles de IgG específica frente a FhCL1 a los 18 dpi en el **experimento 1**. El marcado y significativo ($P < 0,01$) aumento en los niveles de IgG en el líquido peritoneal frente al antígeno recombinante FhCL1 de los animales infectados, confirma la infección por *F. hepatica* y la producción de IgG desde los 18 dpi en el líquido peritoneal. Este es el primer estudio utilizando FhCL1 mediante ELISA para detección en líquido peritoneal y nuestros resultados indican niveles significativos de IgG específica para FhCL1 en líquido peritoneal. Sin embargo, la migración peritoneal de las larvas de *F. hepatica* ocurre en etapas más tempranas de la infección (primeros 10 días tras la infección) por lo que, para conocer si dichos anticuerpos podrían tener cierto papel en la respuesta frente a *F. hepatica* en líquido peritoneal, sería necesario realizar el estudio en fases más tempranas. Por otro lado, dicho estudio tendría sentido sólo en animales vacunados, ya que en la respuesta natural frente a *F. hepatica* los niveles plasmáticos de IgG específica aumentan entre las 2 y las 3 semanas post-infección (Martínez-Moreno y cols., 1999).

Con el fin de conocer la expresión de distintos mediadores moleculares implicados en la respuesta inmune adquirida ejercida por la población de células inmunocompetentes presentes en el líquido peritoneal contra *F. hepatica*, en nuestro estudio se realizó el análisis de la expresión génica de varias citoquinas proinflamatorias y reguladoras mediante qPCR a los 18 dpi. Aunque se detectó cierto incremento en la expresión de IL-12,

IL-23, IL-13, IL-10 y TGF- β y cierto descenso en la expresión de IFN- γ , TNF- α , IL-17, iNOS y Arginasa, ninguno de los valores fueron estadísticamente significativos respecto al grupo control no infectado.

En un estudio llevado a cabo por Başka y colaboradores (2017), macrófagos bovinos se expusieron a LPS y a estimulación con antígenos FhES de aislados de *F. hepatica*, no teniendo ninguno de éstos impacto sobre la liberación de IL-12 por parte de los macrófagos, lo que concuerda con los resultados de nuestro estudio. Por otro lado, Fu y colaboradores (2016), describieron una disminución en la expresión de IL-12 en PBMCs de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica*, lo que contrasta con los resultados de nuestro estudio en líquido peritoneal. Esta diferencia podría ser debida al diferente comportamiento de los PBMCs y de los leucocitos peritoneales, o a la diferente fase de la infección en ambos estudios (7 y 18 dpi, respectivamente).

Las citoquinas TGF- β e IL-10 están implicadas en procesos anti-inflamatorios y procesos de regeneración tisular, en los que se inducen fenómenos de fibrosis. El TGF- β y la IL-10 también juegan un papel clave en minimizar la patología y en intensificar el proceso de la reparación tisular durante las infecciones por helmintos (Belkaid y cols., 2006; Haçariz y cols., 2009). La IL-10 también juega un papel clave en la modulación de la respuesta inmunitaria frente a helmintos (McNeilly y cols., 2013; Mendes y cols., 2013, Valero y cols., 2017). En hígado se ha descrito incremento significativo de IL-10 desde los 3, 9 y 18 dpi en ovejas infectadas con *F. hepatica*, tanto vacunadas como no vacunadas, mientras que el incremento de TGF- β fue significativo solo a los 18 dpi (Pacheco y cols., 2018).

Resulta interesante el hecho de no haber detectado niveles de transcripción de la citoquina IL-4 ya que quizá la transcripción de esta citoquina podría estar inhibida por el TGF- β , fenómeno que se ha observado en la infección por *Nippostrongylus brasiliensis* en células peritoneales de ratón, donde el TGF- β derivado de las células T reguladoras contrarresta la expresión de IL-4 (Macey y cols., 2010). En el caso de *F. hepatica*, se detectaron niveles bajos en la transcripción de IL-4 en el peritoneo de ratones infectados con este parásito a los 14 dpi (Donnelly y cols., 2005). Mediante un estudio de qRT-PCR llevado a cabo por Pacheco y colaboradores (2017), se detalla que la transcripción de IL-4 aumenta en nódulos linfáticos hepáticos de ovejas infectadas con *F. hepatica* a los 9 dpi y en hígado ocurre lo mismo, pero a partir del 18 dpi. Estos datos sugieren que los niveles de IL-4 en la infección temprana por *F. hepatica* dependen de la localización analizada.

Respecto a los niveles de IFN- γ , en nuestro estudio no se observaron diferencias significativas a los 18 dpi respecto al control no infectado, aunque sí una cierta tendencia al descenso. En macrófagos peritoneales de ratón, se ha descrito que la infección con *Brugia malayi* (Loke y cols., 2000) y la inyección intraperitoneal en ratón de oligosacáridos procedentes de *S. mansoni* (Terrazas y cols., 2001), modifica la producción de citoquinas de los linfocitos T para estimular un fenotipo Th2, en el que no se estimula la producción de IFN- γ . Además, ha sido descrito que la mayoría de los linfocitos T CD4⁺ en el peritoneo secretan IL-10, pero no IL-4 o IFN- γ (Walsh y cols., 2009; Dalton y cols., 2013).

En el estudio llevado a cabo por Pacheco y colaboradores (2017), no se detectaron cambios significativos en la expresión de IFN- γ a los 1 y 3 dpi

en muestras de hígado y de nódulo linfático hepático en comparación con el grupo control no infectado. Sin embargo, a los 18 dpi sí que mostraron en hígado un marcado incremento respecto al control negativo. Se ha descrito que IFN- γ juega un papel importante en la formación de granulomas en enfermedades parasitarias como la schistosomiasis (Attia y cols., 2014) y la cisticercosis (Freitas y cols., 2016) y el hecho de que no haya un aumento significativo en las muestras de líquido peritoneal estudiadas en nuestro trabajo pero sí en el de Pacheco y colaboradores (2017) a los 9 y 18 dpi en muestras de hígado, sugieren que en este último tejido tiene lugar una repuesta al daño tisular y formación de granulomas más que una respuesta hacia las larvas parasitarias en sí.

Además, de manera general, nuestros datos sugieren que la respuesta inmunitaria iniciada por la población celular peritoneal en la oveja, compuesta por un 20% de linfocitos en animales 18 dpi, es débil y no se diferencia hacia la típica respuesta de tipo Th2 de las infecciones crónicas. De manera que parece ser que el cambio de la respuesta inmunitaria hacia una de tipo Th2 ocurre después de que el parásito haya penetrado el parénquima hepático y haya causado un daño tisular significativo (Fu y cols., 2016; Pacheco y cols., 2017).

La citoquina TNF- α se ha agrupado dentro del grupo de las citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, puede mostrar propiedades inhibitoras, especialmente cuando se asocia con IL-10 (Kleigwegt y cols., 2010). Nuestros resultados indican que hay una disminución, aunque no significativa, en la expresión de la citoquina TNF α en el líquido peritoneal de ovejas a los 18 dpi en comparación con el grupo control no infectado. En

ratones sometidos a inyección intraperitoneal con FhTeg, se ha demostrado que se inhibe la liberación de TNF- α (Vukman y cols., 2013).

En el trabajo llevado a cabo por Pacheco y colaboradores (2017), tiene lugar un aumento en la expresión de esta citoquina en hígado a los 18 dpi. Este dato sugiere que la dinámica de secreción por parte de los leucocitos peritoneales de la citoquina TNF- α difiere de la que tiene lugar a nivel hepático.

Los resultados en la expresión de la citoquina IL-17 en nuestro trabajo indicaron una disminución. Sin embargo, la citoquina IL-23 aumenta ligeramente. Ambas citoquinas están relacionadas con la diferenciación de linfocitos Th17, asociados a su vez con el mantenimiento de protección a nivel epitelial y con enfermedades inflamatorias de tipo inmunomediado (Gaffen y cols., 2014). La regulación de IL-17 es crítica en el control de la patología inflamatoria asociada a las infecciones con helmintos (Dowling y cols., 2010). Se ha descrito previamente que la fuerte polarización hacia una respuesta de tipo Th2 por parte de los helmintos interfiere en el desarrollo de respuestas tipo Th1/Th17 (Bazzone y cols., 2008), entre los que se incluyen *F. hepatica* (Walsh y cols., 2009). El trabajo llevado a cabo por Dowling y colaboradores (2010), sugiere que las moléculas secretadas por *F. hepatica* suprimen la diferenciación de los linfocitos Th17, inhibiendo la producción de IL-23 por parte de las CD4 y, por lo tanto, impidiendo que estas últimas liberen IL17.

El hecho de que en nuestros resultados se observe un ligero aumento en la expresión de IL-23 a nivel del líquido peritoneal podría ser debido a que existe una estimulación en animales infectados con *F. hepatica* a los 18

dpi para la diferenciación de linfocitos Th17, pero ésta no llega a ser eficaz o suficiente, ya que se constató una baja expresión de IL-17.

Con respecto a la expresión génica de arginasa en el líquido peritoneal, se detectó un descenso que no llegó a ser significativo en los animales de 18 dpi en comparación con el grupo control no infectado. El control de la expresión génica de la arginasa en diferentes tejidos y células regula la disponibilidad de arginina para la producción de óxido nítrico (NO), la cual se genera mediante la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Como intermediario de esta reacción, se genera un producto que, a su vez, es un potente inhibidor de la arginasa (Soler, 2015).

Las citoquinas relacionadas con las respuestas inmunitarias de tipo Th2 inducen a los macrófagos a expresar arginasa 1. De hecho, se ha demostrado que, en macrófagos peritoneales de ratón, es el gen más sobreexpresado en respuesta a IL-4 (Welch y cols., 2002). Se ha sugerido, además, que la actividad de la arginasa está ligada a la patogenia de la infección por parásitos (Hesse y cols., 2001). Parece ser que la principal fuente de arginasa en la infección con *Schistosoma* son los macrófagos presentes en los granulomas parasitarios (Stadecker y cols., 1999). En el caso de *F. hepatica*, los niveles de arginasa en macrófagos de bovinos vacunados con FhCL1 disminuyen significativamente, indicando que la inducción de la actividad alternativa de los parásitos podría estar alterada por la vacunación (Golden y cols., 2010). En un estudio llevado a cabo por Donnelly y colaboradores (2005), la expresión de arginasa 1 se detectó en los macrófagos peritoneales de ratones infectados a las 24 horas pi. Sin embargo, la expresión de arginasa 1 fue mucho más débil que la que e

observó para otro marcador de la activación alternativa de los macrófagos, denominado Fizz1.

La expresión génica de iNOS en nuestro estudio disminuye de forma no significativa en el líquido peritoneal de animales a los 18 dpi en comparación con los animales del grupo control no infectado. Este dato coincide con el obtenido mediante la técnica de inmunocitoquímica, en la que el porcentaje de macrófagos peritoneales que expresan esta enzima en su superficie no difieren de forma significativa de los encontrados en el grupo control no infectado en los **experimentos 1 y 2**. Además, sí que la intensidad de inmunorreacción así como el porcentaje de macrófagos positivos frente a iNOS disminuye en ambos experimentos a los 18 dpi en comparación con el resto de grupos infectados estudiados (1, 3 y 9 dpi) en ambos experimentos. En el estudio llevado a cabo por Donnelly y colaboradores (2005), la expresión génica de iNOS en los macrófagos peritoneales de ratón infectados con *F. hepatica* se detectó a los 21 dpi, pero a niveles bajos. Alrededor del día 14 dpi, la mayoría de los parásitos alcanzan el hígado con migración tisular de los parásitos resultando en liver injury y las células inflamatorias como son los macrófagos producen radicales libres derivados del oxígeno, óxido nítrico y citoquinas inflamatorias en respuesta a la actividad del parásito (Behm y cols., 1999), lo que justificaría la identificación de iNOS.

Se ha demostrado que la vacunación con FhCL1 influye en la disminución de los niveles de arginasa en macrófagos de bovinos, indicando que la inducción de la actividad alternativa de los parásitos podría estar alterada por la vacunación (Golden y cols., 2010). De manera similar, las cabras de 7-9 dpi vacunadas con FhCL1 presentaban una mayor expresión

de Inos en las células peritoneales en comparación con el grupo control infectado.

En el caso de *F. hepatica*, los niveles de arginasa en macrófagos de bovinos vacunados con FhCL1 disminuyen significativamente, indicando que la inducción de la actividad alternativa de los parásitos podría estar alterada por la vacunación (Golden y cols., 2010).

5.4. Estudio proteómico en líquido peritoneal.

Para comprender mejor la respuesta inmunitaria y la patología producida por la infección por *F. hepatica* a nivel del compartimento peritoneal hemos realizado un estudio proteómico con la finalidad de evaluar los cambios en el proteoma de líquido peritoneal inducidos por la infección por *F. hepatica* en ovejas a los 18 dpi. Este tipo de estudio es totalmente novedoso ya que no se ha realizado previamente en rumiantes ni en animales de laboratorio infectados por *F. hepatica*. Ya que el parásito migra desde el intestino hacia el hígado a través del peritoneo, se ha considerado la investigación del compartimento peritoneal de animales infectados podrían proveer nueva información acerca de la respuesta inmunitaria en este compartimento y, a la misma vez, identificar importantes proteínas específicas del hospedador relacionadas con la infección. El análisis proteómico de respuestas del hospedador frente a *F. hepatica* se ha llevado a cabo en conducto biliar y suero del hospedador (Morphew y cols., 2007; Rioux y cols., 2008), representando el análisis del conducto biliar los estados crónicos de la infección cuando los adultos del parásito han migrado ya a través del hígado hacia los conductos biliares (Morphew y cols., 2007) y el análisis del suero representando la respuesta sistémica (Rioux y cols.,

2008). Sin embargo, hasta la fecha el uso de herramientas de proteómica para el análisis del líquido peritoneal solo se ha descrito en pacientes con uremia, endometriosis, cáncer ovárico y casos de diálisis peritoneal (Ferrero y cols., 2007; Ferrero y cols., 2009; Amon y cols., 2010; Wang y cols., 2012). En el trabajo de Rioux y colaboradores (2008), las proteínas transferrina y apolipoproteína A-IV estaban sobreexpresadas en el suero de animales infectados con *F. hepatica* a partir de la semana 9 post-infección.

Para ello, se separaron las proteínas mediante electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y después cortando fracciones por encima y por debajo de las proteínas predominantes del hospedador (albúmina de 67 kDa).

Si bien es cierto que probablemente quedaran excluidas proteínas de las mismas características migracionales que la albúmina, se pudieron identificar 176 proteínas diferentes presentes en el líquido peritoneal. Este dato proporciona el primer paso para la caracterización de las proteínas que podrían jugar un papel importante en la inmunopatología y/o que podrían actuar como biomarcadores de la infección con *F. hepatica*.

Desde el punto de vista del hospedador, los análisis comparativos de nuestros datos proteómicos revelan una fuerte correlación positiva entre las réplicas biológicas de cada estadio (grupo control no infectado: $r = 0,8799$, $P < 0,0001$; grupo infectado: $r = 0,7693$, $P < 0,0001$), con las mismas proteínas identificadas a niveles comparables, basadas en los valores emPAI.

La proteína periostina es de particular interés porque no solo incrementó de manera dramática en el líquido peritoneal de los animales

infectados a los 18 dpi, sino que también fue particularmente abundante en el citoplasma de los hepatocitos localizados alrededor de los focos necróticos, en las células inflamatorias de los propios focos necróticos y en el infiltrado inflamatorio agudo de los espacios porta. Como muchos tipos celulares expresan periostina, incluyéndose células epiteliales, fibroblastos (peritoneo e hígado) y hepatocitos (Sidhu y cols., 2010; Tartibi y Bahna, 2014; Roselli-Murai y cols., 2013; Riener y cols., 2010; Braun y cols., 2013; Conway y cols., 2014; Takayama y cols., 2006; Li y cols., 2015; Parulekar y cols., 2014; Johansson y cols., 2013), la fuente de periostina en el fluido peritoneal podrían ser el propio tejido hepático dañado. De manera alternativa, esta proteína podría estar secretada por los eosinófilos peritoneales, los cuales predominan en la cavidad peritoneal a partir del noveno día post-infección.

Se ha demostrado que la proteína periostina está involucrada en la desdiferenciación celular, deposición de proteínas de matriz extracelular y en los fenómenos de angiogénesis (Liu y cols., 2014; Braun y cols., 2013; Conway y cols., 2014). A nivel del hígado, en el cual parece ser que forma parte de los procesos de reparación y de remodelación tisular, se colocaliza y se une de manera conjunta con las proteínas de matriz extracelular, fibronectina, tenascina C y colágeno fibrilar (I, II, V) para formar una estructura de tejido conectivo. Además de estar involucrado en procesos de fibrosis, la periostina también podría desempeñar un papel en el reclutamiento de eosinófilos y en la migración a través de las proteínas de matriz extracelulares, como se ha observado en estudios relacionados con el asma (Jia y cols., 2012; Li y cols., 2015; Parulekar y cols., 2014; Johansson y cols., 2013). También se ha sugerido que la periostina soluble podría

dirigir la adhesión de los eosinófilos a la fibronectina de la matriz extracelular, aumentando así su supervivencia (Johansson y cols., 2013). Curiosamente, la expresión de periostina está fuertemente relacionada con las patologías mediadas por Th2 (Bobolea y cols., 2015; Masuoka y cols., 2012; Sehra y cols., 2011) y se ha propuesto como un biomarcador de la inflamación Th2 / eosinofílica (Li y cols., 2015). Por ejemplo, se han observado niveles elevados de periostina en el suero de pacientes con hepatitis aguda o crónica (Huang y cols., 2015).

La abundancia de la proteína de adhesión VCAM-1 que se detectó mediante proteómica en la cavidad peritoneal de los animales infectados a los 18 dpi, se corroboró mediante técnicas inmunohistoquímicas mostrando una marcada expresión en el tejido hepático de ovejas infectadas en comparación con el tejido hepático del grupo control no infectado. Este resultado es consistente con los observados en otros estudios en los que la expresión aumentada de VCAM-1 está asociada con enfermedades crónicas del hígado y relacionadas con los conductos biliares (Afford y cols., 2014). Como se ha observado en este estudio, la expresión de VCAM-1 es baja en células que no han sufrido daño mientras que durante la inflamación hepática esta expresión aumenta y se cree que es importante en el reclutamiento de monocitos y linfocitos (Paik y cols., 2003; Jaruga y cols., 2004; Qin y cols., 2006). Cannistra y colaboradores (1994), mostraron que la VCAM-1 funcional se expresa en las células mesoteliales activadas y podría jugar un papel en el brazo distal del tráfico de leucocitos hacia la cavidad abdominal. Además, las células epiteliales intestinales son capaces de expresar VCAM-1 durante la inflamación de la mucosa (Li y cols., 1998),

las cuales podrían pasar hacia el peritoneo después de la migración de los NEJs a través del intestino.

En nuestro estudio se identificaron algunos componentes del sistema del complemento (C1-C9) en los datos de proteómica. En particular, C3, los subcomponentes C1g y s, y la proteína C4BP mostraron incremento en los animales infectados (18 dpi), estando C3 incrementado significativamente ($P < 0,0029$). C3 es la proteína original del C3a, la cual ha demostrado tener propiedades quimioatrayentes para los eosinófilos (DiScipio y cols., 2007) y, por lo tanto, la escisión proteolítica de esta proteína podría estar asociada con el incremento en los eosinófilos peritoneales observados. La importancia de la cascada del complemento durante la infección por *F. hepatica* está acentuada por el análisis transcriptómico del hígado llevado a cabo por Alvarez-Rojas y colaboradores (2015), que hallaron una sobreexpresión de genes relacionados con el sistema del complemento a las 2 semanas post infección, particularmente la proteína inhibidora del complemento C4BP, la cual se ha demostrado que tiene efecto anti-inflamatorio e inmunomodulador (Olivar y cols. 2013). Estudios *in vitro* han mostrado que la activación del complemento en la superficie de estadios juveniles de *S. mansoni* puede mediar la muerte del parásito (Ramalho-Pinto y cols., 1978; Vignali y cols., 1988). Mientras que diversos estudios han demostrado que algunos parásitos, incluido *F. hepatica*, son capaces de inhibir tanto la forma clásica como la alternativa del sistema del complemento como parte del conjunto de estrategias que utilizan para sobrevivir (Montgomery y cols., 1986; Baeza y cols., 1994), la posible interacción entre la cascada del complemento y las formas juveniles de *F. hepatica* merecen más investigaciones.

El análisis proteómico realizado en este trabajo también detectó la presencia de proteínas de la matriz extracelular procedentes del hígado en el líquido peritoneal, que están probablemente asociados con el daño hepático causado por la actividad digestiva de la migración de los parásitos. El colágeno VI fue particularmente abundante, quizá no de una manera sorpresiva dado que forma parte del tejido conectivo, formando redes de ramificación que se unen a otras proteínas de la matriz extracelular. La participación del colágeno en la formación de esta red de tejido conjuntivo aumenta durante el proceso de fibrosis hepática y un incremento de su forma soluble en la circulación de los pacientes con enfermedad hepática crónica se utiliza como marcador de daño hepático y de fibrosis hepática (Schuppan y cols., 2001; Rühl y cols., 1999; Atkinson y cols., 1996; Mak y cols., 2014). La expresión génica del colágeno VI está sobreexpresada en hígados de oveja infectadas con *F. hepatica* de 8 semanas post infección (Álvarez-Rojas y cols., 2015), indicando que tiene un papel en la remodelación tisular tras la infección parasitaria.

Otro marcador temprano del daño hepático es la expresión incrementada y deposición de la proteína de adhesión fibronectina (Hahn y cols., 1980; Odenthal y cols., 1993; Rescan y cols., 1993), la cual es activamente secretada por las células estrelladas hepáticas en respuesta al daño hepático (Huang y cols., 2015). En nuestro estudio se observaron niveles elevados de fibronectina en el fluido peritoneal, que junto con los de colágeno VI, podrían ser liberados por el hígado a medida que las formas juveniles de *F. hepatica* migran activamente a través del tejido conectivo del hígado, más que cuando penetran a través de las estructuras fibrilares de colágeno (colágeno I, III y V) en esta etapa temprana. La capacidad de

descubrir interacciones entre el huésped y el parásito ahora puede completarse a través de la disponibilidad de amplios conjuntos de datos bioinformáticos tanto para *F. hepatica* (Robinson y cols., 2009; Young y cols., 2010; Cancela y cols., 2010; Cwiklinski y cols., 2015) como para varios hospedadores definitivos de este parásito, incluyéndose los genomas tanto de bovino como de ovino (Reese y cols., 2010; Childers y cols., 2011; Jiang y cols., 2014). En particular, nuestro estudio fue posible gracias a la disposición y al acceso del genoma de *Ovis aries* más reciente (Jiang y cols., 2014). Además, actualmente se están llevando a cabo estudios que analizan respuestas específicas del hospedador usando transcriptómica (Cadman y cols., 2014; Rojas-Caraballo y cols., 2015; Fu y cols., 2016; Álvarez-Rojas y cols., 2016). Un reciente estudio llevado a cabo por Álvarez-Rojas y colaboradores (2015), describe los cambios transcriptómicos observados en el hígado de ovejas infectadas con *F. hepatica* a las 8 semanas post-infección, incluyéndose algunos genes sobreexpresados ligados a los procesos de fibrosis (genes relacionados con TGF- β , calponina, transgelinas y osteopontina) y marcadores relacionados con la respuesta celular de los linfocitos T, como son el TGF- β y el TNF. Se ha observado que la proteína osteopontina, junto con la periostina, tiene un papel en mediar la inflamación crónica de rinosinusitis mediante la inducción de una respuesta proliferativa de las proteínas de la matriz extracelular (Daines y cols., 2011). Debido a que los procesos de fibrosis comienzan normalmente a partir de las 4 semanas post infección, la periostina podría estar facilitando la remodelación hepática sin inducir fibrosis con anterioridad a la inducción de otras proteínas asociadas con los procesos de fibrosis, como se ha observado en el tejido miocárdico (Kühn y cols., 2007; Ma y cols., 2015). En nuestro trabajo, no se observó expresión de IFN- γ en animales a los 18

dpi, lo cual podría estar relacionado con la expresión IL18BP, ya que éste se ha descrito como un inhibidor natural del IFN- γ (Novick y cols., 1999). Sin embargo, la expresión de IL18BP requiere investigaciones adicionales. Aunque la sobreexpresión de TGF- β es consistente con nuestro estudio, el resto de marcadores que se han encontrado sobreexpresados en el caso de animales de 8 semanas post infección son diferentes, reflejando que las muestras usadas para el análisis (tejido y células) son diferentes y que el perfil de la respuesta inmunitaria cambia durante el transcurso de la infección. Nuestro estudio centrado en la infección temprana en el compartimento peritoneal ha identificado marcadores inmunitarios relacionados con la fasciolosis temprana. Dado que hemos observado que los niveles en suero de GLDH y de GGT no son marcadores fiables del daño hepático en etapas previas a los 18 dpi, y que la respuesta inmunitaria no se ha diferenciado aún, este estudio ha identificado nuevas moléculas asociadas con la infección temprana con *F. hepatica* en esta etapa. Estos marcadores biológicos podrían ser útiles para el desarrollo de futuros métodos de diagnóstico y también de estrategias de vacunación para definir respuestas inmunitarias protectoras.

Se necesita la realización de estudios complementarios enfocados en los mecanismos utilizados por el parásito *F. hepatica* para modular la respuesta inmunitaria en rumiantes, particularmente durante fases tempranas de la infección, cuando el parásito es más vulnerable a la respuesta inmunitaria.

CONCLUSIONES

1. El recuento absoluto de leucocitos peritoneales aumentó a los 9 y 18 dpi en los dos experimentos, sugiriendo un reclutamiento activo de leucocitos en estadios tempranos de la infección por *F. hepatica* en oveja.
2. El recuento diferencial de leucocitos peritoneales mostró un marcado incremento de eosinófilos a los 9 dpi y particularmente a los 18 dpi, lo que influyó en la disminución relativa de macrófagos a los 9 y 18 dpi y de linfocitos a los 18 dpi.
3. El aumento significativo en la expresión de CD206 desde el día 1 post-infección en ambos experimentos y la escasa variación en la expresión de iNOS, sugieren una activación alternativa o M2 de los macrófagos peritoneales desde el primer dpi en ovejas infectadas por *F. hepatica*.
4. La ausencia de diferencias significativas en la expresión génica de las citoquinas IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-23 y de los factores TGF- β , IFN- γ , TNF- α , iNOS y Arginasa, a los 18 dpi respecto al grupo control no infectado, podría ser debida a la elevada variabilidad individual y a que la respuesta inmunitaria en peritoneo todavía no ha sido estimulada.
5. El análisis proteómico comparativo del líquido peritoneal de ovejas infectadas a los 18 dpi identificó un total de 176 proteínas, entre las que se encontraron proteínas estructurales derivadas de la matriz extracelular hepática, del tejido conectivo y del epitelio y proteínas relacionadas con el sistema inmunitario.
6. Las proteínas periostina y la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) fueron las más abundantes en el líquido peritoneal de las ovejas infectadas con *F. hepatica* a los 18 dpi en comparación con el grupo

control no infectado, lo que indica un incremento de la adhesión y migración leucocitaria hacia el compartimento peritoneal.

7. La inmunolocalización de las proteínas periostina y VCAM-1 en el tejido hepático de las ovejas infectadas con *F. hepatica* a los 18 dpi, sugiere el posible origen hepático de la presencia de estas proteínas en el líquido peritoneal.

CONCLUSIONS

1. The absolute count of peritoneal leucocytes increased at 9 and 18 dpi in both experiments, suggesting an active recruitment of leucocytes in early stages of infection with *F. hepatica* in sheep.
2. The differential count of peritoneal leucocytes showed a marked increase of eosinophils at 9 dpi and particularly at 18 dpi, resulting in a relative decrease of macrophages at 9 and 18 dpi and lymphocytes at 18 dpi.
3. The significant increase in CD206 expression since 1 dpi in both experiments together with the little variation observed in iNOS expression suggest that an alternative M2 activation of peritoneal macrophages is taking place in sheep infected with *F. hepatica* since the first dpi.
4. The fact that no significant differences were found in the genetic expression of cytokines IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-23 and factors TGF- β , IFN- γ , TNF- α , iNOS and Arginase at 18 dpi comparing with the uninfected control group could be due to the high individual variability together with the fact that the immune response in the peritoneum has not been yet stimulated.
5. The comparative proteomic analysis between the peritoneal fluid of sheep infected with *F. hepatica* at 18 dpi and non-infected sheep identified a total of 176 proteins, including liver extracellular matrix proteins and proteins related to the connective tissue, the epithelium and the immune system.
6. The periostin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) were the most abundant proteins within the peritoneal fluid of sheep infected with *F. hepatica* at 18 dpi and these have been described to be involved in the leucocyte recruitment and adhesion to the peritoneal compartment.

7. The immunolocalization of periostin and VCAM-1 proteins within the liver tissue of sheep infected with *F. hepatica* at 18 dpi suggests the hepatic origin of the presence of these proteins within the peritoneal fluid.

BIBLIOGRAFÍA

- **Aarvak, T., Chabaud, M., Miossec, P., Natvig, J.B.,** 1999. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. *J. Immunol.* 162, 1246-51.
- **Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A.,** 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
- **Acosta-Rodriguez, E. V, Napolitani, G., Lanzavecchia, A., Sallusto, F.,** 2007. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* 8, 942-949.
- **Adams, P.N., Aldridge, A., Vukman, K. V., Donnelly, S., O'Neill, S.M.,** 2014. *Fasciola hepatica* tegumental antigens indirectly induce an M2 macrophage-like phenotype in vivo. *Parasite Immunol.* 36, 531-539.
- **Aerts-Toegaert, C., Heirman, C., Tuyaerts, S., Corthals, J., Aerts, J.L., Bonehill, A., Thielemans, K., Breckpot, K.,** 2007. CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses. *Eur. J. Immunol.* 37, 686-695.
- **Afford, S.C., Humphreys, E.H., Reid, D.T., Russell, C.L., Banz, V.M., Oo, Y., Vo, T., Jenne, C., Adams, D.H., Eksteen, B.,** 2014. Vascular cell adhesion molecule 1 expression by biliary epithelium promotes persistence of inflammation by inhibiting effector T-cell apoptosis. *Hepatology* 59, 1932-1943.
- **Afshan, K., Valero, M.A., Qayyum, M., Peixoto, R.V., Magraner, A., Mas-Coma, S.,** 2014. Phenotypes of intermediate forms of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in buffaloes from Central Punjab, Pakistan. *J. Helminthol.* 88, 417-426.
- **Ahmad, A., Wang, C.H., Bell, R.G., Kisselgof, A.B., Thornton, E.M., Miller, H.R., Friend, D.S., Oettgen, H.C.,** 1991. A role for IgE in intestinal immunity. Expression of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in rats transfused with IgE and thoracic duct lymphocytes. *J. Immunol.* 146, 3563-70.
- **Aldridge, A., O'Neill, S.M.,** 2016. *Fasciola hepatica* tegumental antigens induce anergic-like T cells via dendritic cells in a mannose receptor-dependent manner. *J. Immunol* 196, 1180-1192.
- **Allen, J.E., Maizels, R.M.,** 1997. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol. Today* 18, 387-92.

- **Al-Rukibat, R., Ismail, Z.B., Al-Majali, A., Al-Zghoul, M.,** 2006. Peritoneal fluid analysis in adult, nonpregnant Awassi sheep. *Vet. Clin. Pathol.* 35, 215-218.
- **Alvarez Rojas, C.A., Scheerlinck, J.-P., Ansell, B.R.E., Hall, R.S., Gasser, R.B., Jex, A.R.,** 2016. Time-Course Study of the Transcriptome of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from Sheep Infected with *Fasciola hepatica*. *PLoS One* 11, e0159194.
- **Alvarez Rojas, C.A., Scheerlinck, J.-P., Ansell, B.R.E., Hall, R.S., Gasser, R.B., Jex, A.R.,** 2016. Time-Course Study of the Transcriptome of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from Sheep Infected with *Fasciola hepatica*. *PLoS One* 11, e0159194.
- **Alvarez Rojas, C.A., Ansell, B.R.E., Hall, R.S., Gasser, R.B., Young, N.D., Jex, A.R., Scheerlinck, J.-P.Y.,** 2015. Transcriptional analysis identifies key genes involved in metabolism, fibrosis/tissue repair and the immune response against *Fasciola hepatica* in sheep liver. *Parasit. Vectors* 8, 124.
- **Alvarez Rojas, C.A., Ansell, B.R.E., Hall, R.S., Gasser, R.B., Young, N.D., Jex, A.R., Scheerlinck, J.-P.Y.,** 2015. Transcriptional analysis identifies key genes involved in metabolism, fibrosis/tissue repair and the immune response against *Fasciola hepatica* in sheep liver. *Parasit. Vectors* 8, 124.
- **Alvarez-Sánchez, M.A., Mainar-Jaime, R.C., Pérez-García, J., Rojo-Vázquez, F.A.,** 2006. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet. Rec.* 159, 424-5.
- **Amon, L.M., Law, W., Fitzgibbon, M.P., Gross, J.A., O'Briant, K., Peterson, A., Drescher, C., Martin, D.B., McIntosh, M.,** 2010. Integrative Proteomic Analysis of Serum and Peritoneal Fluids Helps Identify Proteins that Are Up-Regulated in Serum of Women with Ovarian Cancer. *PLoS One* 5, e11137.
- **Ampem, G., Azegrouz, H., Bacsadi, Á., Balogh, L., Schmidt, S., Thuróczy, J., Röszer, T.,** 2016. Adipose tissue macrophages in non-rodent mammals: a comparative study. *Cell Tissue Res.* 363, 461-478.
- **Anderson, P.H., Berrett, S., Brush, P.J., Hebert, C.N., Parfitt, J.W., Patterson, D.S.,** 1977. Biochemical indicators of liver injury in calves with experimental fascioliasis. *Vet. Rec.* 100, 43-5.

- **Andrews, S.**, 1999. The life cycle of *Fasciola hepatica*. En: Dalton, J.P. (Ed.), Fasciolosis. CABI Publishing, Cambridge, UK., pp. 1-29.
- **Anthony, R.M., Urban, J.F., Alem, F., Hamed, H.A., Rozo, C.T., Boucher, J.-L., Van Rooijen, N., Gause, W.C., Gause, W.C.**, 2006. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat. Med.* 12, 955-60.
- **Apt, W., Aguilera, X., Vega, F., Alcaíno, H., Zulantay, I., Apt, P., González, V., Retamal, C., Rodríguez, J., Sandoval, J.**, 1993. [Prevalence of fascioliasis in humans, horses, pigs, and wild rabbits in 3 Chilean provinces]. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* 115, 405-14.
- **Aranzamendi, C., Fransen, F., Langelaar, M., Franssen, F., van der Ley, P., van Putten, J.P.M., Rutten, V., Pinelli, E.**, 2012. *Trichinella spiralis*-secreted products modulate DC functionality and expand regulatory T cells in vitro. *Parasite Immunol.* 34, 210-23.
- **Arias, M.S., Piñeiro, P., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Hillyer, G.V., Díez-Baños, P., Paz-Silva, A., Morrondo, P.**, 2013. Relationship between exposure to *Fasciola hepatica* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and cattle extensively reared in an endemic area. *Res. Vet. Sci.* 95, 1031-1035.
- **Atkinson, J.C., Rühl, M., Becker, J., Ackermann, R., Schuppan, D.**, 1996. Collagen VI Regulates Normal and Transformed Mesenchymal Cell Proliferation in Vitro. *Exp. Cell Res.* 228, 283-291.
- **Baeza, E., Poitou, I., Villejoubert, C., Boulard, C.**, 1994. Complement depletion in rats infected with *Fasciola hepatica*: in vivo and in vitro studies. *Vet. Parasitol.* 51, 219-230.
- **Balic, A., Harcus, Y., Holland, M., Maizels, R.**, 2004. Selective maturation of dendritic cells by *Nippostrongylus brasiliensis*-secreted proteins drives Th2 immune responses. *Eur. J. Immunol.* 34, 3047-3059.
- **Barclay, A.N.**, 1997. The leucocyte antigen facts book. Academic Press.
- **Basham, T.Y., Merigan, T.C.**, 1983. Recombinant interferon-gamma increases HLA-DR synthesis and expression. *J. Immunol.* 130, 1492-4.
- **Bąska, P., Norbury, L.J., Zawistowska-Deniziak, A., Wiśniewski, M., Januszkiewicz, K.**, 2017. Excretory/secretory products from two *Fasciola hepatica*

isolates induce different transcriptional changes and IL-10 release in LPS-activated bovine “BOMA” macrophages. *Parasitol. Res.* 116, 2775-2782.

- **Bazzone, L.E., Smith, P.M., Rutitzky, L.I., Shainheit, M.G., Urban, J.F., Setiawan, T., Blum, A.M., Weinstock, J. V, Stadecker, M.J.,** 2008. Coinfection with the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* markedly reduces hepatic egg-induced immunopathology and proinflammatory cytokines in mouse models of severe schistosomiasis. *Infect. Immun.* 76, 5164-72.
- **Becker, S., Daniel, E.G.,** 1990. Antagonistic and additive effects of IL-4 and Interferon- γ on human monocytes and macrophages: Effects on Fc receptors, HLA-D antigens, and superoxide production. *Cell. Immunol.* 129, 351-362.
- **Beesley, N.J., Williams, D.J.L., Paterson, S., Hodgkinson, J.,** 2017. *Fasciola hepatica* demonstrates high levels of genetic diversity, a lack of population structure and high gene flow: possible implications for drug resistance. *Int. J. Parasitol.* 47, 11-20.
- **Behm, C., Sangster, N.,** 1999. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. En: JP. Dalton (ed.) *Fasciolosis.* (Ed.), *Fasciolosis.* CABI Publishing, Cambridge, UK., pp. 185-224.
- **Belkaid, Y., Blank, R.B., Suffia, I.,** 2006. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol. Rev.* 212, 287-300.
- **Belkaid, Y., Tarbell, K.,** 2009. Regulatory T Cells in the Control of Host-Microorganism Interactions. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 551-589.
- **Bennett, C.E.,** 1975. Surface Features, Sensory Structures, and Movement of the Newly Excysted Juvenile *Fasciola hepatica* L. *J. Parasitol.* 61, 886.
- **Berry C.I. y Dargie J.D,** 1976. The role of host nutrition in the pathogenesis of ovine fascioliasis. *Vet. Parasitol.* 2, 317-332.
- **Bettelli, E., Korn, T., Kuchroo, V.K.,** 2007. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 652-7.
- **Bobolea, I., Barranco, P., Del Pozo, V., Romero, D., Sanz, V., López-Carrasco, V., Canabal, J., Villasante, C., Quirce, S.,** 2015. Sputum periostin in patients with different severe asthma phenotypes. *Allergy* 70, 540-546.

- **Bogdan, C., Paik, J., Vodovotz, Y., Nathan, C., 1992.** Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J. Biol. Chem.* 267, 23301-8.
- **Bogdan, C., Vodovotz, Y., Nathan, C., 1991.** Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* 174, 1549-55.
- **Bohn, E., Schmitt, E., Bielfeldt, C., Noll, A., Schulte, R., Autenrieth, I.B., 1998.** Ambiguous role of interleukin-12 in *Yersinia enterocolitica* infection in susceptible and resistant mouse strains. *Infect. Immun.* 66, 2213-20.
- **Boray, J.C., 1969.** Experimental Fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.* 7, 95-210.
- **Boray, J.C., 1967.** Studies on experimental infections with *Fasciola hepatica*, with particular reference to acute fascioliasis in sheep. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 61, 439-50.
- **Boray, J.C., Crowfoot, P.D., Strong, M.B., Allison, J.R., Schellenbaum, M., Von Orelli, M. Sarasin, G., 1983.** Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infection in sheep with triclabendazole. *Vet. Rec.* 113, 315-317.
- **Bossaert, K., Farnir, F., Leclipteux, T., Protz, M., Lonneux, J.F., Losson, B., 2000.** Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 87, 103-23.
- **Bossaert, K., Jacquinet, E., Saunders, J., Farnir, F., Losson, B., 2000.** Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 88, 17-34.
- **Braun, N., Sen, K., Alscher, M.D., Fritz, P., Kimmel, M., Morelle, J., Goffin, E., Jörres, A., Wüthrich, R.P., Cohen, C.D., Segerer, S., 2013.** Periostin: a matricellular protein involved in peritoneal injury during peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.* 33, 515-28.
- **Brennan, G.P., Fairweather, I., Trudgett, A., Hoey, E., McCoy, McConville, M., Meaney, M., Robinson, M., McFerran, N., Ryan, L., Lanusse, C., Mottier, L., Alvarez, L., Solana, H., Virkel, G., Brophy, P.M., 2007.** Understanding triclabendazole resistance. *Exp. Mol. Pathol.* 82, 104-109.
- **Brewis, I.A., Brennan, P., 2010.** Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 80, 1-44.

- **Briseño, C.G., Murphy, T.L., Murphy, K.M.,** 2014. Complementary diversification of dendritic cells and innate lymphoid cells. *Curr. Opin. Immunol.* 29, 69-78.
- **Buffoni, L., Martínez-Moreno, F.J., Zafra, R., Mendes, R.E., Pérez-Écija, A., Sekiya, M., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, A.,** 2012. Humoral immune response in goats immunised with cathepsin L1, peroxiredoxin and Sm14 antigen and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 185, 315-21.
- **Butterworth, A.E., David, J.R.,** 1981. Eosinophil Function. *N. Engl. J. Med.* 304, 154-156.
- **Butterworth, A.E.,** 1985. Cell-Mediated Damage to Helminths. *Adv. Parasitol.* 23, 143-235.
- **Cadman, E.T., Thyse, K.A., Bearder, S., Cheung, A.Y.N., Johnston, A.C., Lee, J.J., Lawrence, R.A.,** 2014. Eosinophils Are Important for Protection, Immunoregulation and Pathology during Infection with Nematode Microfilariae. *PLoS Pathog.* 10, e1003988.
- **Cameron, T.C., Cooke, I., Faou, P., Toet, H., Piedrafita, D., Young, N., Rathinasamy, V., Beddoe, T., Anderson, G., Dempster, R., Spithill, T.W.,** 2017. A novel ex vivo immunoproteomic approach characterising *Fasciola hepatica* tegumental antigens identified using immune antibody from resistant sheep. *Int. J. Parasitol.* 47, 555-567.
- **Cancela, M., Ruétalo, N., Dell'Oca, N., da Silva, E., Smircich, P., Rinaldi, G., Roche, L., Carmona, C., Alvarez-Valín, F., Zaha, A., Tort, J.F.,** 2010. Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics* 11, 227.
- **Cannistra, S.A., Ottensmeier, C., Tidy, J., DeFranzo, B.,** 1994. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by peritoneal mesothelium partly mediates the binding of activated human T lymphocytes. *Exp. Hematol.* 22, 996-1002.
- **Cao, H., Wolff, R.G., Meltzer, M.S., Crawford, R.M.,** 1989. Differential regulation of class II MHC determinants on macrophages by IFN-gamma and IL-4. *J. Immunol.* 143, 3524-31.

- **Carasi, P., Rodríguez, E., da Costa, V., Frigerio, S., Brossard, N., Noya, V., Robello, C., Anegón, I., Freire, T., 2017.** Heme-Oxygenase-1 Expression Contributes to the Immunoregulation Induced by *Fasciola hepatica* and Promotes Infection. *Front. Immunol.* 8, 883.
- **Carmona, C., McGonigle, S., Dowd, A.J., Smith, A.M., Coughlan, S., McGowran, E., Dalton, J.P., 1994.** A dipeptidylpeptidase secreted by *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 109 (1), 113-8.
- **Carrada Bravo, T., Escamilla Martínez, J.R., 2005.** Imágenes de patología clínica. Fasciolosis: revisión clínico-epidemiológica actualizada. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 52, 83-96.
- **Carrada-Bravo, T., 2007.** *Fasciola hepatica*: Ciclo biológico y potencial biótico. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 54, 21-27.
- **Castellheim, A., Brekke, O.-L., Espevik, T., Harboe, M., Mollnes, T.E., 2009.** Innate Immune Responses to Danger Signals in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis. *Scand. J. Immunol.* 69, 479-491.
- **Catchpole, B.N., Snow, D., 1952.** Human ectopic fascioliasis. *Lancet* 260, 711-712.
- **Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., Colonna, M., 1999.** Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 5, 919-923.
- **Cervi, L., MacDonald, A.S., Kane, C., Dzierszinski, F., Pearce, E.J., 2004.** Cutting edge: dendritic cells copulsed with microbial and helminth antigens undergo modified maturation, segregate the antigens to distinct intracellular compartments, and concurrently induce microbe-specific Th1 and helminth-specific Th2 responses. *J. Immunol.* 172, 2016-20.
- **Charlier, J., Soenen, K., De Roeck, E., Hantson, W., Ducheyne, E., Van Coillie, F., De Wulf, R., Hendrickx, G., Vercruysse, J., 2014.** Longitudinal study on the temporal and micro-spatial distribution of *Galba truncatula* in four farms in Belgium as a base for small-scale risk mapping of *Fasciola hepatica*. *Parasit. Vectors* 7, 528.

- **Chauvin, A., Bouvet, G., Boulard, C.,** 1995. Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. Int. J. Parasitol. 25, 1227-41.
- **Chauvin, A., Boulard, C.,** 1996. Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. Parasite 3, 209-215.
- **Chemale, G., Morphew, R., Moxon, J. V., Morassuti, A.L., LaCourse, E.J., Barrett, J., Johnston, D.A., Brophy, P.M.,** 2006. Proteomic analysis of glutathione transferases from the liver fluke parasite, *Fasciola hepatica*. Proteomics 6, 6263-6273.
- **Chemale, G., Perally, S., LaCourse, E.J., Prescott, M.C., Jones, L.M., Ward, D., Meaney, M., Hoey, E., Brennan, G.P., Fairweather, I., Trudgett, A., Brophy, P.M.,** 2010. Comparative Proteomic Analysis of Triclabendazole Response in the Liver Fluke *Fasciola hepatica*. J. Proteome Res. 9, 4940-4951.
- **Chen M.G., Mott, K.E.,** 1990. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. Trop. Dis. Bull. 87, R1-R38.
- **Chensue, S.W., Warmington, K.S., Allenspach, E.J., Lu, B., Gerard, C., Kunkel, S.L., Lukacs, N.W.,** 1999. Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. J. Immunol. 163, 165-73.
- **Childers, C.P., Reese, J.T., Sundaram, J.P., Vile, D.C., Dickens, C.M., Childs, K.L., Salih, H., Bennett, A.K., Hagen, D.E., Adelson, D.L., Elsik, C.G.,** 2011. Bovine Genome Database: integrated tools for genome annotation and discovery. Nucleic Acids Res. 39, D830-D834.
- **Chung, J.-Y., Bae, Y.-A., Yun, D.-H., Yang, H.-J., Kong, Y.,** 2012. Experimental Murine Fascioliasis Derives Early Immune Suppression with Increased Levels of TGF- β and IL-4. Korean J. Parasitol. 50, 301-308.
- **Clark, E.A., Ledbetter, J.A.,** 1994. How B and T cells talk to each other. Nature 367, 425-428.
- **Clery, D.G., Mulcahy, G.,** 1998. Lymphocyte and cytokine responses of young cattle during primary infection with *Fasciola hepatica*. Res. Vet. Sci. 65, 169-71.

- **Cohn, Z.A.**, 1978. Activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. *J. Immunol.* 121, 813-6.
- **Collins, P.R., Stack, C.M., O'Neill, S.M., Doyle, S., Ryan, T., Brennan, G.P., Mousley, A., Stewart, M., Maule, A.G., Dalton, J.P., Donnelly, S.**, 2004. Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *J. Biol. Chem.* 279, 17038-46.
- **Consortium, T.E.P.**, 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57-74.
- **Conway, S.J., Izuhara, K., Kudo, Y., Litvin, J., Markwald, R., Ouyang, G., Arron, J.R., Holweg, C.T.J., Kudo, A.**, 2014. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 1279-1288.
- **Cordero M., Rojo F.A., Marínez A.R., Sánchez A., Hernández S., Navarrete I., Díez P., Quiroz H., Carvalho M.**, 2010. *Parasitología general* (primera edición). McGraw Hill Interamericana de España S.L.
- **Correia, L., Podevin, P., Borderie, D., Verthier, N., Montet, J.-C., Feldmann, G., Poupon, R., Weill, B., Calmus, Y.**, 2001. Effects of bile acids on the humoral immune response A mechanistic approach. *Life Sci.* 69, 2337-2348.
- **Cortés, A., Muñoz-Antoli, C., Esteban, J.G., Toledo, R.**, 2017. Th2 and Th1 Responses: Clear and Hidden Sides of Immunity Against Intestinal Helminths. *Trends Parasitol.* 33, 678-693.
- **Crawford, R.M., Finbloom, D.S., Ohara, J., Paul, W.E., Meltzer, M.S.**, 1987. B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. *J. Immunol.* 139, 135-41.
- **Cwiklinski, K., Dalton, J.P.**, 2018. Advances in *Fasciola hepatica* research using 'omics' technologies. *Int. J. Parasitol.* 48, 321-331.
- **Cwiklinski, K., Dalton, J.P., Dufresne, P.J., Course, J. La, Williams, D.J., Hodgkinson, J., Paterson, S.**, 2011. The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution.
- **Daines, S.M., Wang, Y., Orlandi, R.R.**, 2011. Periostin and osteopontin are overexpressed in chronically inflamed sinuses. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 1, 101-105.

- **Dalton J.P., Brindley, P.J.**, 1997. Proteases of trematodes. En: Advances in trematode biology. CRC Press, Baton Raton y Nueva York., pp. 265-308.
- **Dalton, J.P., Tom, T.D., Strand, M.**, 1985. *Fasciola hepatica*: comparison of immature and mature immunoreactive glycoproteins. Parasite Immunol. 7, 643-57.
- **Dalton, J.P., Day, S.R., Drew, A.C., Brindley, P.J.**, 1997. A method for the isolation of schistosome eggs and miracidia free of contaminating host tissues. Parasitology.
- **Dalton, J.P., Robinson, M.W., Mulcahy, G., O'Neill, S.M., Donnelly, S.**, 2013. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. Vet. Parasitol. 195, 272-285.
- **Dalton, J.P., Neill, S.O., Stack, C., Collins, P., Walshe, A., Sekiya, M., Doyle, S., Mulcahy, G., Hoyle, D., Khaznadji, E., Moiré, N., Brennan, G., Mousley, A., Kreshchenko, N., Maule, A.G., Donnelly, S.M.**, 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. Int. J. Parasitol. 33, 1173-81.
- **D'Andrea, A., Ma, X., Aste-Amezaga, M., Paganin, C., Trinchieri, G.**, 1995. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. J. Exp. Med. 181, 537-46.
- **Dargie J.D.**, 1981. Blood protein turnover in parasitized ruminants. En: Isotopes and Radiation in Parasitology IV. Int. At. Energy Agency, Vienna, pp. 155-170.
- **Davies, S.J., Smith, S.J., Lim, K.C., Zhang, H., Purchio, A.F., McKerrow, J.H., West, D.B.**, 2005. In vivo imaging of tissue eosinophilia and eosinopoietic responses to schistosome worms and eggs. Int. J. Parasitol. 35, 851-859.
- **Dawes, B.**, 1963. Hyperplasia of the bile duct in fascioliasis and its relation to the problem of nutrition in the liver-fluke, *Fasciola hepatica* L. Parasitology 53, 123.
- **Dawes, B.**, 1961. On the Early Stages of *Fasciola hepatica* Penetrating into the Liver of an Experimental Host, the Mouse: a Histological Picture. J. Helminthol. 35, 41.

- **Dawes, B.**, 1963. The migration of juvenile forms of *Fasciola hepatica* L. through the wall of the intestines in the mouse, with some observations on food and feeding. *Parasitology* 53, 109.
- **Dawes, B., Hughes, D.L.**, 1964. Fascioliasis: the Invasive Stages of *Fasciola hepatica* in Mammalian Hosts. *Adv. Parasitol.* 2, 97-168.
- **Değer, Y., Ertekin, A., Değer, S., Mert, H.**, 2008. Lipid peroxidation and antioxidant potential of sheep liver infected naturally with distomatosis. *Türkiye parazitolojii Derg.* 32, 23-6.
- **De-Haro Arteaga, I.**, 2004. Fasciolosis. En: *Parasitología Médica*. Mc GrawHill, pp. 157-163.
- **Dessein, A., Kouriba, B., Eboumbou, C., Dessein, H., Argiro, L., Marquet, S., Elwali, Nasr-Eldin M.A., Rodrigues, V., Li, Y., Doumbo, O., Chevillard, C.**, 2004. Interleukin-13 in the skin and interferon-gamma in the liver are key players in immune protection in human schistosomiasis. *Immunol. Rev.* 201, 180-90.
- **Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L., Gregory, C.D.**, 1998. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392, 505-509.
- **Di Maggio, L.S., Tirloni, L., Pinto, A.F.M., Diedrich, J.K., Yates III, J.R., Benavides, U., Carmona, C., da Silva Vaz, I., Berasain, P.**, 2016. Across intra-mammalian stages of the liver fluke *Fasciola hepatica*: a proteomic study. *Sci. Rep.* 6, 32796.
- **Ding, A., Nathan, C.F., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr, D.J., Srimal, S.**, 1990. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *J. Immunol.* 145, 940-4.
- **DiScipio, R.G., Schraufstatter, I.U.**, 2007. The role of the complement anaphylatoxins in the recruitment of eosinophils. *Int. Immunopharmacol.* 7, 1909-1923.
- **Dittmar, K., Teegen, W.R.**, 2003. The presence of *Fasciola hepatica* (liver-fluke) in humans and cattle from a 4,500 year old archaeological site in the Saale-Unstrut valley, Germany. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98 Suppl 1, 141-3.

- **Dixon, K.E.**, 1966. The physiology of excystment of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology* 56, 431.
- **Donnelly, S., O'Neill, S.M., Sekiya, M., Mulcahy, G., Dalton, J.P.**, 2005. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect. Immun.* 73, 166-73.
- **Donnelly, S., Stack, C.M., O'Neill, S.M., Sayed, A.A., Williams, D.L., Dalton, J.P.**, 2008. Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *FASEB J.* 22, 4022-32.
- **Dow, C., Ross, J.G., Todd, J.R.**, 1968. The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Parasitology* 58, 129-35.
- **Dowling, D.J., Hamilton, C.M., Donnelly, S., La Course, J., Brophy, P.M., Dalton, J., O'Neill, S.M.**, 2010. Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. *Infect. Immun.* 78, 793-801.
- **Doy, T.G., Hughes, D.L.**, 1982. In vitro cell adherence to newly excysted *Fasciola hepatica*: failure to affect their subsequent development in rats. *Res. Vet. Sci.* 32, 118-20.
- **Doy, T.G., Hughes, D.L., Harness, E.**, 1981. Hypersensitivity in rats infected with *Fasciola hepatica*: possible role in protection against a challenge infection. *Res. Vet. Sci.* 30, 360-3.
- **Duffus, W.P., Franks, D.**, 1980. In vitro effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola hepatica*. *Clin. Exp. Immunol.* 41, 430-40.
- **Duque Correa, M.A., Rojas López, M.**, 2007. Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología* 26, 73-86.
- **Duvallet, E., Semerano, L., Assier, E., Falgarone, G., Boissier, M.C.**, 2011. Interleukin-23: A key cytokine in inflammatory diseases. *Ann. Med.* 43, 503-511.
- **Dzik, J.M., Golos, B., Jagielska, E., Zielinski, Z., Walajtys-Rode, E.**, 2004. A non-classical type of alveolar macrophage response to *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunol.* 26, 197-205.
- **Escamilla, A., Pérez-Caballero, R., Zafra, R., Bautista, M.J., Pacheco, I.L., Ruiz, M.T., Martínez-Cruz, M.S., Martínez-Moreno, A., Molina-Hernández,**

V., **Pérez, J.**, 2017. Apoptosis of peritoneal leucocytes during early stages of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 238, 49-53.

▪ **Jennings F.W.**, 1976. The anaemias of parasitic infections. En: E.J.L., S. (Ed.), *Pathophysiology of Parasitic Infection*. Academic Press, Nueva York., pp. 41-67.

▪ **Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., Henson, P.M.**, 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* 101, 890-8.

▪ **Fairweather, I.**, 2011. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? *Vet. Parasitol.* 180, 133-143.

▪ **Falcón, C., Carranza, F., Martínez, F.F., Knubel, C.P., Masih, D.T., Motrán, C.C., Cervi, L.**, 2010. Excretory-secretory products (ESP) from *Fasciola hepatica* induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137, 36-46.

▪ **Farina, A., Dumonceau, J.-M., Lescuyer, P.**, 2009. Proteomic analysis of human bile and potential applications for cancer diagnosis. *Expert Rev. Proteomics* 6, 285-301.

▪ **Fearon, D.T., Locksley, R.M.**, 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-3.

▪ **Ferre, I., Barrio, J.P., González-Gallego, J., Rojo-Vázquez, F.A.**, 1994. Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* L. *Vet. Parasitol.* 55, 71-9.

▪ **Ferre, I., Ortega-Mora, L.M., Rojo-Vázquez, F.A.**, 1995. Seroprevalence of *Fasciola hepatica* infection in sheep in northwestern Spain. *Parasitol. Res.* 81, 137-142.

▪ **Ferre, I., López, P., Rojo-Vázquez, F.A., González-Gallego, J.**, 1996. Experimental ovine fasciolosis: antipyrine clearance as indicator of liver damage. *Vet. Parasitol.* 62, 93-100.

▪ **Ferrero, S., Gillot, D.J., Remorgida, V., Anserini, P., Leung K., Ragni, N., Grudzinskas J.G.**, 2007. Proteomic Analysis of Peritoneal Fluid in Women with Endometriosis. *J. Proteome Res.* 6, 9, 3402-3411

- **Ferrero, S., Gillott, D.J., Remorgida, V., Anserini, P., Ragni, N., Grudzinskas, J.G.,** 2009. Proteomic analysis of peritoneal fluid in fertile and infertile women with endometriosis. *J. Reprod. Med.* 54, 32-40.
- **Ferrick, D.A., King, D.P., Jackson, K.A., Braun, R.K., Tam, S., Hyde, D.M., Beaman, B.L.,** 2000. Intraepithelial gamma delta T lymphocytes: sentinel cells at mucosal barriers. *Springer Semin. Immunopathol.* 22, 283-96.
- **Figuerola-Santiago, O., Espino, A.M.,** 2014. *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein induces the alternative activation of human macrophages. *Infect. Immun.* 82, 5005-12.
- **Finkelman F., B.D., Svetic, A., Gresser, I., Snapper, C., Holmes, J., Trotta, P.P., Katona, I.M., Gause, W.C.,** 1991. Regulation by Interferon alpha of Immunoglobulin Isotype Selection and Lymphokine Production in Mice. *J. Exp Med.* 174:1179-88.
- **Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A.,** 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147, 3815-22.
- **Flynn, R.J., Irwin, J.A., Olivier, M., Sekiya, M., Dalton, J.P., Mulcahy, G.,** 2007. Alternative activation of ruminant macrophages by *Fasciola hepatica*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 120, 31-40.
- **Flynn, R.J., Mulcahy, G.,** 2008. The roles of IL-10 and TGF- β in controlling IL-4 and IFN- γ production during experimental *Fasciola hepatica* infection. *Int. J. Parasitol.* 38, 1673-1680.
- **Flynn, R.J., Mulcahy, G., Elsheikha, H.M.,** 2010. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: Implications for control. *Vet. Parasitol.* 169, 235-240.
- **Fox, N.J., White, P.C.L., McClean, C.J., Marion, G., Evans, A., Hutchings, M.R.,** 2011. Predicting impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk. *PLoS One* 6, e16126.
- **Fürst, T., Keiser, J., Utzinger, J.,** 2012. Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 12, 210-221.

- **Fu, Y., Chryssafidis, A.L., Browne, J.A., O'Sullivan, J., McGettigan, P.A., Mulcahy, G.,** 2016. Transcriptomic Study on Ovine Immune Responses to *Fasciola hepatica* Infection. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, e0005015.
- **Gaffen, S.L., Jain, R., Garg, A. V, Cua, D.J.,** 2014. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. Nat. Rev. Immunol. 14, 585-600.
- **Gajadhar, A.A., Scandrett, W.B., Forbes, L.B.,** 2006. Overview of food- and water-borne zoonotic parasites at the farm level. Rev. Sci. Tech. 25, 595-606.
- **Garcia-Campos, A., Ravidà, A., Nguyen, D.L., Cwiklinski, K., Dalton, J.P., Hokke, C.H., O'Neill, S., Mulcahy, G.,** 2016. Tegument Glycoproteins and Cathepsins of Newly Excysted Juvenile *Fasciola hepatica* Carry Mannosidic and Paucimannosidic N-glycans. PLoS Negl. Trop. Dis.
- **Garza-Cuartero, L., O'Sullivan, J., Blanco, A., McNair, J., Welsh, M., Flynn, R.J., Williams, D., Diggle, P., Cassidy, J., Mulcahy, G.,** 2016. *Fasciola hepatica* infection reduces Mycobacterium bovis burden and mycobacterial uptake and suppresses the pro-inflammatory response. Parasite Immunol. 38, 387-402.
- **Gause, W.C., Urban, J.F., Stadecker, M.J.,** 2003. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. Trends Immunol. 24, 269-77.
- **Gavin, M.A., Rasmussen, J.P., Fontenot, J.D., Vasta, V., Manganiello, V.C., Beavo, J.A., Rudensky, A.Y.,** 2007. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. Nature 445, 771-775.
- **Genicot, B., Mouligneau, F., Lekeux, P.,** 1991. Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. Zentralbl. Veterinarmed. B 38, 203-8.
- **Gerrard, T.L., Dyer, D.R., Mostowski, H.S.,** 1990. IL-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor selectively increase HLA-DR and HLA-DP antigens but not HLA-DQ antigens on human monocytes. J. Immunol. 144, 4670-4.
- **Gironès, N., Valero, M.A., García-Bodelón, M.A., Chico-Calero, I., Punzón, C., Fresno, M., Mas-Coma, S.,** 2007. Immune Suppression in Advanced Chronic Fascioliasis: An Experimental Study in a Rat Model. J. Infect. Dis. 195, 1504-1512.

- **Giuliani, M.M., Biolchi, A., Serruto, D., Ferlicca, F., Vienken, K., Oster, P., Rappuoli, R., Pizza, M., Donnelly, J.,** 2010. Measuring antigen-specific bactericidal responses to a multicomponent vaccine against serogroup B meningococcus. *Vaccine* 28, 5023-5030.
- **Gleich, G.J., Loegering, D.A.,** 1984. Immunobiology of Eosinophils. *Annu. Rev. Immunol.* 2, 429-459.
- **Goerdts, S., Politz, O., Schledzewski, K., Birk, R., Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Klemke, C.D., Dippel, E., Kodelja, V., Orfanos, C.E.,** 1999. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 67, 222-6.
- **Golden, O., Flynn, R.J., Read, C., Sekiya, M., Donnelly, S.M., Stack, C., Dalton, J.P., Mulcahy, G.,** 2010. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine* 28, 5551-5557.
- **González, L.C., Esteban, J.G., Bargues, M.D., Valero, M.A., Ortiz, P., Náquira, C., Mas-Coma, S.,** 2011. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Trop.* 120, 119-129.
- **Gonzalez-Lanza, C., Manga-Gonzalez, Y., Del-Pozo-Carnero, P., Hidalgo-Argüello, R.,** 1989. Dynamics of elimination of the eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in the faeces of cattle in the Porma Basin, Spain. *Vet. Parasitol.* 34, 35-43.
- **Gordon, S.,** 1976. Macrophage neutral proteinases and chronic inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 278, 176-89.
- **Gordon, S.,** 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23-35.
- **Gordon, S., Martinez, F.O.,** 2010. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* 32, 593-604.
- **Gordon, S., Plüddemann, A., Martínez Estrada, F.,** 2014. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol. Rev.* 262: 36-55.
- **Graczyk T.K., Fried B.,** 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. En: Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis*. CABI Publishing, pp. 31-46.

- **Gruden-Movsesijan, A., Ilic, N., Colic, M., Majstorovic, I., Vasilev, S., Radovic, I., Sofronic-Milosavljevic, L.,** 2011. The impact of *Trichinella spiralis* excretory–secretory products on dendritic cells. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 429-439.
- **Guasconi, L., Serradell, M.C., Garro, A.P., Iacobelli, L., Masih, D.T.,** 2011. C-type lectins on macrophages participate in the immunomodulatory response to *Fasciola hepatica* products. *Immunology* 133, 386-396.
- **Guasconi, L., Serradell, M.C., Masih, D.T.,** 2012. *Fasciola hepatica* products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148, 359-363.
- **Haçarız, O., Sayers, G., Flynn, R.J., Lejeune, A., Mulcahy, G.,** 2009. IL-10 and TGF- β 1 are associated with variations in fluke burdens following experimental fasciolosis in sheep. *Parasite Immunol.* 31, 613-622.
- **Haçarız, O., Sayers, G., Baykal, A.T.,** 2012. A Proteomic Approach To Investigate the Distribution and Abundance of Surface and Internal *Fasciola hepatica* Proteins during the Chronic Stage of Natural Liver Fluke Infection in Cattle. *J. Proteome Res.* 11, 3592-3604.
- **Haçarız, O., Baykal, A.T., Akgün, M., Kavak, P., Sağiroğlu, M.Ş., Sayers, G.P.,** 2014. Generating a detailed protein profile of *Fasciola hepatica* during the chronic stage of infection in cattle. *Proteomics* 14, 1519-1530.
- **Hagan, P.,** 1993. IgE and protective immunity to helminth infections. *Parasite Immunol.* 15, 1-4.
- **Hahn, E., Wick, G., Pencev, D., Timpl, R.,** 1980. Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. *Gut* 21, 63-71.
- **Hamilton, C.M., Dowling, D.J., Loscher, C.E., Morphew, R.M., Brophy, P.M., O'Neill, S.M.,** 2009. The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. *Infect. Immun.*
- **Hanna, R.E.B.,** 1980. *Fasciola hepatica*: Autoradiography of protein synthesis, transport, and secretion by the tegument. *Exp. Parasitol.* 50, 297-304.
- **Hard, G.C.,** 1970. Some biochemical aspects of the immune macrophage. *Br. J. Exp. Pathol.* 51, 97-105.

- **Haroun, E.T., Hillyer, G.V.**, 1986. Resistance to fascioliasis--a review. *Vet. Parasitol.* 20, 63-93.
- **Hayashi, N., Matsui, K., Tsutsui, H., Osada, Y., Mohamed, R.T., Nakano, H., Kashiwamura, S., Hyodo, Y., Takeda, K., Akira, S., Hada, T., Higashino, K., Kojima, S., Nakanishi, K.**, 1999. Kupffer cells from *Schistosoma mansoni*-infected mice participate in the prompt type 2 differentiation of hepatic T cells in response to worm antigens. *J. Immunol.* 163, 6702-11.
- **Herbert, B.R., Hö Ischer, C., Mohrs, M., Arendse, B., Schwegmann, A., Radwanska, M., Leeto, M., Kirsch, R., Hall, P.**, 2004. Alternative Macrophage Activation Is Essential for Survival during Schistosomiasis and Downmodulates T Helper 1 Responses and Immunopathology. *Immunity* 20, 623-635.
- **Hernández-González, A., Valero, M.L., Pino, M.S. del, Oleaga, A., Siles-Lucas, M.**, 2010. Proteomic analysis of in vitro newly excysted juveniles from *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 172, 121-128.
- **Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A.C., Schito, M., Fuentes, J.M., Cheever, A.W., Pearce, E.J., Wynn, T.A.**, 2001. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol.* 167, 6533-44.
- **Hillyer, G.V.**, 2005. Fasciola antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J. Helminthol.* 79, 241-7.
- **Hogan, S.P., Rosenberg, H.F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P.S., Lacy, P., Kay, A.B., Rothenberg, M.E.**, 2008. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clin. Exp. Allergy* 38, 709-750.
- **Holmes P.H., Dargie J.D., Maclean .J.M., Mulligan,W.**, 1968. Albumin and globulin turnover in chronic ovine fascioliasis. *Vet. Rec.* 83(9), 227-228.
- **Hotez, P.J., Savioli, L., Fenwick, A.**, 2012. Neglected Tropical Diseases of the Middle East and North Africa: Review of Their Prevalence, Distribution, and Opportunities for Control. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1475.
- **Howe, K.L., Bolt, B.J., Shafie, M., Kersey, P., Berriman, M.**, 2017. WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. *Mol. Biochem. Parasitol.* 215, 2-10.

- **Huang, Y., Liu, W., Xiao, H., Maitikabili, A., Lin, Q., Wu, T., Huang, Z., Liu, F., Luo, Q., Ouyang, G.,** 2015. Matricellular Protein Periostin Contributes to Hepatic Inflammation and Fibrosis. *Am. J. Pathol.* 185, 786-797.
- **Hughes D.L., Hanna RE, S.H.,** 1981. *Fasciola hepatica*: IgG and IgA levels in the serum and bile of infected cattle. *Exp Parasitol.* 52(2):271-.
- **Huntley, J.F., Newlands, G., Miller, H.R.P.,** 1984. The isolation and characterization of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. *Parasite Immunol.* 6, 371-390.
- **Illescas Gómez, P., Llamas Trujillo, R., Ardoy del Hoyo, L., Llamas Cruz, A., Fernández Valdivia, J.,** 1994. Infestaciones naturales por parásitos gastrointestinales en ovinos y caprinos en la provincia de Granada.
<http://www.insacan.org/racvao/anales/1994/articulos/07-1994-12.pdf>
- **Infante-Duarte, C., Horton, H.F., Byrne, M.C., Kamradt, T.,** 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.* 165, 6107-15.
- **Irving, D.O., Howell, M.J.,** 1982. Characterization of excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 85, 179.
- **Iwakura, Y., Ishigame, H.,** 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* 116, 1218-1222.
- **James, S.L., Lazdins, J.K., Meltzer, M.S., Sher, A.,** 1982. Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. *Cell. Immunol.* 67, 255-66.
- **Janeway, C.A., Jones, B., Hayday, A.,** 1988. Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunol. Today* 9, 73-6.
- **Jang, J.C., Chen, G., Wang, S.H., Barnes, M.A., Chung, J.I., Camberis, M., Le Gros, G., Cooper, P.J., Steel, C., Nutman, T.B., Lazar, M.A., Nair, M.G.,** 2015. Macrophage-Derived Human Resistin Is Induced in Multiple Helminth Infections and Promotes Inflammatory Monocytes and Increased Parasite Burden. *PLoS Pathog.* 11, e1004579.
- **Jaruga, B., Hong, F., Kim, W.-H., Gao, B.,** 2004. IFN- γ /STAT1 acts as a proinflammatory signal in T cell-mediated hepatitis via induction of multiple

chemokines and adhesion molecules: a critical role of IRF-1. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 287, G1044-G1052.

- **Jarvis, E.D.**, 2016. Perspectives from the Avian Phylogenomics Project: Questions that Can Be Answered with Sequencing All Genomes of a Vertebrate Class. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 4, 45-59.
- **Jedlina, L., Kozak-Ljunggren, M., Wedrychowicz, H.**, 2011. In vivo studies of the early, peritoneal, cellular and free radical response in rats infected with *Fasciola hepatica* by flow cytometric analysis. *Exp. Parasitol.*
- **Jefferies, J.R., Brophy, P.M., Barrett, J.**, 2000. Investigation of *Fasciola hepatica* sample preparation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 21, 3724-3729.
- **Jefferies, J.R., Campbell, A.M., Rossum, A.J. van, Barrett, J., Brophy, P.M.**, 2001. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics* 1, 1128-1132.
- **Jemli M.H., Braun J.P., Dorchie P., Romdhane M.N., Kilani M.**, 1993. Exploration biochimique e thematologique chez l'agneau infesté experimentalement pau *Fasciola hepatica*. *Rec. Med. Vet. Ec. Alfort.* 169, 241-249.
- **Jenkins, S.J., Mountford, A.P.**, 2005. Dendritic cells activated with products released by schistosome larvae drive Th2-type immune responses, which can be inhibited by manipulation of CD40 costimulation. *Infect. Immun.* 73, 395-402.
- **Jia, G., Erickson, R.W., Choy, D.F., Mosesova, S., Wu, L.C., Solberg, O.D., Shikotra, A., Carter, R., Audusseau, S., Hamid, Q., Bradding, P., Fahy, J. V., Woodruff, P.G., Harris, J.M., Arron, J.R.**, 2012. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 647-654.e10.
- **Jiang, Y., Xie, M., Chen, W., Talbot, R., Maddox, J.F., Faraut, T., Wu, C., Muzny, D.M., Li, Y., Zhang, W., Stanton, J.-A., Brauning, R., Barris, W.C., Hourlier, T., Aken, B.L., Searle, S.M.J., Adelson, D.L., Bian, C., Cam, G.R., Chen, Y., Cheng, S., DeSilva, U., Dixen, K., Dong, Y., Fan, G., Franklin, I.R., Fu, S., Guan, R., Highland, M.A., Holder, M.E., Huang, G., Ingham, A.B., Jhangiani, S.N., Kalra, D., Kovar, C.L., Lee, S.L., Liu, W., Liu, X., Lu, C., Lv, T., Mathew, T., McWilliam, S., Menzies, M., Pan, S., Robelin, D., Servin, B., Townley, D.,**

Wang, W., Wei, B., White, S.N., Yang, X., Ye, C., Yue, Y., Zeng, P., Zhou, Q., Hansen, J.B., Kristensen, K., Gibbs, R.A., Flicek, P., Warkup, C.C., Jones, H.E., Oddy, V.H., Nicholas, F.W., McEwan, J.C., Kijas, J., Wang, J., Worley, K.C., Archibald, A.L., Cockett, N., Xu, X., Wang, W., Dalrymple, B.P., Dalrymple, B.P., 2014. The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. *Science* 344, 1168-1173.

- **Johansson, M.W., Annis, D.S., Mosher, D.F., 2013.** α M β 2 Integrin-Mediated Adhesion and Motility of IL-5-Stimulated Eosinophils on Periostin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 48, 503-510.
- **Joint FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture., 1981.** Isotopes and radiation in parasitology IV : proceedings of an Advisory Group Meeting on the Immunology and Pathogenesis of Parasitic Infections in Ruminants and the Influence of Genetic and Nutritional Factors. International Atomic Energy Agency.
- **Kabelitz, D., Peters, C., Wesch, D., Oberg, H.H., 2013.** Regulatory functions of $\gamma\delta$ T cells. *Int. Immunopharmacol.* 16, 382-387.
- **Kalantari, P., Morales, Y., Miller, E.A., Jaramillo, L.D., Ponichtera, H.E., Wuethrich, M.A., Cheong, C., Seminario, M.C., Russo, J.M., Bunnell, S.C., Stadecker, M.J., 2018.** CD209a Synergizes with Dectin-2 and Mincle to Drive Severe Th17 Cell-Mediated Schistosome Egg-Induced Immunopathology. *Cell Rep.* 22, 1288-1300.
- **Kania, P.W., Sorensen, R.R., Koch, C., Brandt, J., Kliem, A., Vitved, L., Hansen, S., Skjodt, K., 2010.** Evolutionary conservation of mannan-binding lectin (MBL) in bony fish: Identification, characterization and expression analysis of three bona fide collectin homologues of MBL in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 29, 910-920.
- **Karnovsky M.L., Lazdins J, Simons S.R., 1975.** Metabolism of activated mononuclear phagocytes of rest and during phagocytosis. Van Furth R ed. Oxford, Edinbg. Melb. Blackwell Sci. Publ. 423.
- **Karnovsky, M.L., Lazdins, J.K., 1978.** Biochemical criteria for activated macrophages. *J. Immunol.* 121, 809-13.

- **Katakura, T., Miyazaki, M., Kobayashi, M., Herndon, D.N., Suzuki, F.,** 2004. CCL17 and IL-10 as effectors that enable alternatively activated macrophages to inhibit the generation of classically activated macrophages. *J. Immunol.* 172, 1407-13.
- **Kawano, J., Yamamoto, T., Koga, M., Shimizu, A., Kimura, S.,** 1992. Penetration in vitro of newly excysted juvenile flukes of Japanese *Fasciola sp.* through ligated intestines of rabbits, mice, rats and chickens. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 69-73.
- **Keiser, J., Utzinger, J.,** 2009. Food-borne trematodiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 466-83.
- **Kelley, J.M., Elliott, T.P., Beddoe, T., Anderson, G., Skuce, P., Spithill, T.W.,** 2016. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol.* 32, 458-469.
- **Kelly, W.R.,** 1993. The liver and biliary system. En: Jubb K.V.F., Kennedy P.C., P.N. (Ed.), *Pathology of domestic animals*. pp. 97-168.
- **Kendall, S.B., Parfi't, J.W.,** 1962. The Chemotherapy of Fascioliasis. *Brit. vet. J.* 8.
- **Kęsik, M., Jedlina-Panasiuk, L., Kozak-Cięszczyk, M., Plucienniczak, A., Wędrychowicz, H.,** 2007. Enteral vaccination of rats against *Fasciola hepatica* using recombinant cysteine proteinase (cathepsin L1). *Vaccine* 25, 3619-3628.
- **Khallaayoune, K., Stromberg, B.E., Dakkak, A., Malone, J.B.,** 1991. Seasonal dynamics of *Fasciola hepatica* burdens in grazing timahdit sheep in Morocco. *Int. J. Parasitol.* 21, 307-314.
- **Kiefer, F., Brumell, J., Al-Alawi, N., Latour, S., Cheng, A., Veillette, A., Grinstein, S., Pawson, T.,** 1998. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcγ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4209-20.
- **King, D.P., Jones, P.P.,** 1983. Induction of Ia and H-2 antigens on a macrophage cell line by immune interferon. *J. Immunol.* 131, 315-8.
- **Kita, H.,** 2013. Eosinophils: Multifunctional and Distinctive Properties. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 161, 3-9.
- **Kleijwegt, F.S., Laban, S., Duinkerken, G., Joosten, A.M., Zaldumbide, A., Nikolic, T., Roep, B.O.,** 2010. Critical Role for TNF in the Induction of Human

Antigen-Specific Regulatory T Cells by Tolerogenic Dendritic Cells. *J. Immunol.* 185, 1412-1418.

- **Klion, A.D., Nutman, T.B.,** 2004. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 30-37.
- **Knox, D.P., Skuce, P.J.,** 2005. SAGE and the quantitative analysis of gene expression in parasites. *Trends Parasitol.* 21, 322-326.
- **Koepli, K.-P., Paten, B., O'Brien, S.J., O'Brien, S.J.,** 2015. The Genome 10K Project: A Way Forward. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 3, 57-111.
- **Kondo, E., Kanai, K.,** 1977. Phospholipid distribution pattern in uninduced (resident) and casein-induced mouse peritoneal cells. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 30, 269-73.
- **Konno, A., Hashimoto, Y., Kon, Y., Okada, K., Davis, W.C., Sugimura, M.,** 1995. Expression of gamma delta T cell receptor on caprine globule leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48, 105-12.
- **Konopka, B.,** 1993. Occurrence of parasites in slaughter animals in Kielce region (central Poland) in 1987-1992. *Med. Weter.* 49, 373-374.
- **Kreider, T., Anthony, R.M., Urban, J.F., Gause, W.C.,** 2007. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 448-453.
- **Krieg, A.M.,** 2002. CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 709-760.
- **Kühn, B., del Monte, F., Hajjar, R.J., Chang, Y.-S., Lebeche, D., Arab, S., Keating, M.T.,** 2007. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat. Med.* 13, 962-969.
- **Kuijk, L.M., Klaver, E.J., Kooij, G., van der Pol, S.M.A., Heijnen, P., Bruijns, S.C.M., Kringel, H., Pinelli, E., Kraal, G., de Vries, H.E., Dijkstra, C.D., Bouma, G., van Die, I.,** 2012. Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation. *Mol. Immunol.* 51, 210-218.
- **Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, y cols.,** 2001. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

- **Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2001.** Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat. Immunol.* 2, 487-492.
- **Laskin, D.L., Weinberger, B., Laskin, J.D., 2001.** Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 70, 163-70.
- **Lee, C.G., Zimmerman, G.L., Bishop, J.K., 1992.** Host influence on the banding profiles of whole-body protein and excretory-secretory product of *Fasciola hepatica* (Trematoda) by isoelectric focusing. *Vet. Parasitol.* 41, 57-68.
- **Lee, C.G., Zimmerman, G.L., Mulrooney, D.M., 1992.** Isoelectric focusing of soluble proteins from *Fasciola hepatica* L, 1758 and *Fascioloides magna* B, 1875. *Am. J. Vet. Res.* 53, 246-50.
- **LeibundGut-Landmann, S., Groß, O., Robinson, M.J., Osorio, F., Slack, E.C., Tsoni, S.V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G.D., Ruland, J., Reis e Sousa, C., 2007.** Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat. Immunol.* 8, 630-638.
- **Lenton, L.M., Bygrave, F.L., Behm, C.A., Boray, J.C., 1996.** *Fasciola hepatica* infection in sheep: changes in liver metabolism. *Res. Vet. Sci.* 61, 152-6.
- **Leptak, C.L., McKerrow, J.H., Tsutsui, H., Osada, Y., Mohamed, R.T., Nakano, H., Kashiwamura, S., Hyodo, Y., Takeda, K., Akira, S., Hada, T., Higashino, K., Kojima, S., Nakanishi, K., 1997.** Schistosome egg granulomas and hepatic expression of TNF-alpha are dependent on immune priming during parasite maturation. *J. Immunol.* 158, 301-7.
- **Li, W., Gao, P., Zhi, Y., Xu, W., Wu, Y., Yin, J., Zhang, J., 2015.** Periostin: its role in asthma and its potential as a diagnostic or therapeutic target. *Respir. Res.* 16, 57.
- **Li, X.C., Jevnikar, A.M., Grant, D.R., 1997.** Expression of Functional ICAM-1 and VCAM-1 Adhesion Molecules by an Immortalized Epithelial Cell Clone Derived from the Small Intestine. *Cell. Immunol.* 175, 58-66.
- **Liao, W.T., Yu, H.S., Arbiser, J.L., Hong, C.H., Govindarajan, B., Chai, C.Y., Shan, W.J., Lin, Y.F., Chen, G.S., Lee, C.H., 2010.** Enhanced MCP-1 release by keloid CD14+ cells augments fibroblast proliferation: role of MCP-1 and Akt pathway in keloids. *Exp. Dermatol.* 19, e142-e150.

- **Liu, A.Y., Zheng, H., Ouyang, G.,** 2014. Periostin, a multifunctional matricellular protein in inflammatory and tumor microenvironments. *Matrix Biol.* 37, 150-156.
- **Loke, P., Nair, M.G., Parkinson, J., Guiliano, D., Blaxter, M., Allen, J.E.,** 2002. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol.* 3, 7.
- **Lotfollahzadeh, S., Mohri, M., Bahadori, S.R., Dezfouly, M.R.M., Tajik, P.,** 2008. The relationship between normocytic, hypochromic anaemia and iron concentration together with hepatic enzyme activities in cattle infected with *Fasciola hepatica*. *J. Helminthol.* 82, 85-8.
- **Lund, M.E., Greer, J., Dixit, A., Alvarado, R., McCauley-Winter, P., To, J., Tanaka, A., Hutchinson, A.T., Robinson, M.W., Simpson, A.M., O'Brien, B.A., Dalton, J.P., Donnelly, S.,** 2016. A parasite-derived 68-mer peptide ameliorates autoimmune disease in murine models of Type 1 diabetes and multiple sclerosis. *Sci. Rep.* 6, 37789.
- **Lund, M.E., O'Brien, B.A., Hutchinson, A.T., Robinson, M.W., Simpson, A.M., Dalton, J.P., Donnelly, S.,** 2014. Secreted proteins from the helminth *Fasciola hepatica* inhibit the initiation of autoreactive T cell responses and prevent diabetes in the NOD mouse. *PLoS One* 9, e86289.
- **Macey, M.R., Sturgill, J.L., Morales, J.K., Falanga, Y.T., Morales, J., Norton, S.K., Yerram, N., Shim, H., Fernando, J., Gifillan, A.M., Gomez, G., Schwartz, L., Oskeritzian, C., Spiegel, S., Conrad, D., Ryan, J.J.,** 2010. IL-4 and TGF-beta 1 counterbalance one another while regulating mast cell homeostasis. *J. Immunol.* 184, 4688-95.
- **Machado, D.C., Horton, D., Harrop, R., Peachell, P.T., Helm, B.A.,** 1996. Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigen-specific IgE. *Eur. J. Immunol.* 26, 2972-2980.
- **Mackanness, G.B.,** 1962. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* 116, 381-406.
- **Mackanness, G.B.,** 1964. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J. Exp. Med.* 120, 105-20.

- **Maggioli, G., Acosta, D., Silveira, F., Rossi, S., Giacaman, S., Basika, T., Gayo, V., Rosadilla, D., Roche, L., Tort, J., Carmona, C., 2011.** The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine* 29, 9057-9063.
- **Maizels, R.M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M.D., Allen, J.E., 2004.** Helminth parasites - masters of regulation. *Immunol. Rev.* 201, 89-116.
- **Maizels, R.M., Holland, M.J., 1998.** Parasite immunity: Pathways for expelling intestinal helminths. *Curr. Biol.* 8, R711-R714.
- **Mak, K.M., Sehgal, P., Harris, C.K., 2014.** Factor VIII-Related Antigen Detects Phenotypic Change of Sinusoidal to Vascular Endothelium in Hepatic Fibrosis of Elderly Cadavers. *Int. Sch. Res. Not.* 2014, 1-10.
- **Mandl, M., Schmitz S., Weber, C., Hristov, M., 2014.** Characterization of the CD14 Monocyte Population in Human Bone Marrow.
- **Manga, Y., González-Lanza, C., Del Pozo, P., Hidalgo, R., 1990.** Kinetics of *Fasciola hepatica* egg passage in the faeces of sheep in the Porma basin, Spain. *Acta Parasitol. Pol.* 35, 149-157.
- **Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A., 2002.** Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549-55.
- **Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004.** The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677-686.
- **Maqbool, A., Hashmi, H.A., Shafique, M., Akhtar, T., Ahmad, M., Mahmood, F., 2000.** Epidemiology and chemotherapy of fascioliasis in goats. *Indian J. Anim. Res* 34, 33-36.
- **Martin, J., Rosa, B.A., Ozersky, P., Hallsworth-Pepin, K., Zhang, X., Bhonagiri-Palsikar, V., Tyagi, R., Wang, Q., Choi, Y.-J., Gao, X., McNulty, S.N., Brindley, P.J., Mitreva, M., 2015.** Helminth.net: expansions to Nematode.net and an introduction to Trematode.net. *Nucleic Acids Res.* 43, D698-706.

- **Martin, P., Leibovich, S.J.**, 2005. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 15, 599-607.
- **Martínez, A., Martínez-Cruz, M.S., Martínez, F.J., Gutierrez, P.N., Hernández, S.**, 1996. Detection of antibodies to *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens in experimentally infected goats by enzyme immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.* 62, 247-252.
- **Martinez, F.O., Helming, L., Gordon, S.**, 2009. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451-483.
- **Martínez-Moreno, A., Martínez-Cruz, M.S., Martínez, F.J., Gutiérrez, P.N., Hernández, S.**, 1996. Detection of antibodies to *Fasciola hepatica* excretory secretory antigens in experimentally infected goats by enzyme immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.* 62, 247-252.
- **Martínez-Moreno, A., Martínez-Moreno, F.J., Acosta, I., Gutiérrez, P.N., Becerra, C., Hernández, S.**, 1997. Humoral and cellular immune responses to experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. *Parasitol. Res.* 83, 680-6.
- **Martínez-Moreno, A., Jiménez-Luque, V., Moreno, T., Redondo, E.S.H., De Las Mulas, J.M., Pérez, J.**, 1999. Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Vet. Parasitol.* 82, 19-33.
- **Martínez-Moreno, A., Jiménez-Luque, V., Cámara, S., Martínez-Moreno, F.J., Acosta, I., Hernández, S.**, 2000. Oxidative responses during bacterial phagocytosis of polymorphonuclear leucocytes in primarily and secondarily *Fasciola hepatica* infected goats. *Int. J. Parasitol.* 30, 1013-7.
- **Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M.**, 2014. Immunological features of LPS from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* 97, 329-332.
- **Martínez-Valladares, M., Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Cordero-Pérez, C., Famularo, M. del R., Fernández-Pato, N., González-Lanza, C., Castañón-Ordóñez, L., Rojo-Vázquez, F.A.**, 2013. Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to

climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasit. Vectors* 6, 282.

- **Martín-Fontecha, A., Thomsen, L.L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F.,** 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for TH1 priming. *Nat. Immunol.* 5, 1260-1265.
- **Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Valero, M.A.,** 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 35: 1255-1278.
- **Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D.,** 2009. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv. Parasitol.* 69: 41-146.
- **Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D.,** 2009. Chapter 2 Fasciola, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. En: *Advances in parasitology*. pp. 41-146.
- **Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D.,** 2014. Fascioliasis. *Adv.Exp. Med.*
- *Biol.* 766, 77-114. **Masuoka, M., Shiraishi, H., Ohta, S., Suzuki, S., Arima, K., Aoki, S., Toda, S., Inagaki, N., Kurihara, Y., Hayashida, S., Takeuchi, S., Koike, K., Ono, J., Noshiro, H., Furue, M., Conway, S.J., Narisawa, Y., Izuhara, K.,** 2012. Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *J. Clin. Invest.* 122, 2590-600.
- **Matsuzaki, G., Umemura, M.,** 2007. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol. Immunol.* 51, 1139-47.
- **Mauro, A., Russo, V., Di Marcantonio, L., Berardinelli, P., Martelli, A., Muttini, A., Mattioli, M., Barboni, B.,** 2016. M1 and M2 macrophage recruitment during tendon regeneration induced by amniotic epithelial cell allotransplantation in ovine. *Res. Vet. Sci.* 105, 92-102.
- **McCole, D.F., Doherty, M.L., Torgerson, P.R., Baird, A.W.,** 1998. Local immune responses in colon from cattle infected with *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1733-7.
- **Medzhitov, R.,** 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.

- **Meeusen, E., Lee, C.S., Rickard, M.D., Brandon, M.R.,** 1995. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunol.* 17, 37-45.
- **Miller, H.R., Jarrett, W.F.,** 1971. Immune reactions in mucous membranes. I. Intestinal mast cell response during helminth expulsion in the rat. *Immunology* 20, 277-88.
- **Mitchell, M.,** 1995. The distribution and epidemiology of liver fluke in New Zealand. *Surveillance* 22, 22-26.
- **Molina, E.C., Skerratt, L.F.,** 2005. Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*. *Vet. Parasitol.* 131, 157-163.
- **Molina, E.C., Lozano, S.P., Barraca, A.P.,** 2006. The relationship between haematological indices, serum gamma-glutamyl transferase and glutamate dehydrogenase, visual hepatic damage and worm burden in cattle infected with *Fasciola gigantica*. *J. Helminthol.* 80, 277-9.
- **Molina-Hernández, V., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, Á., Donnelly, S., O'Neill, S.M., Dalton, J.P., Cwiklinski, K.,** 2015. *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Vet. Parasitol.* 208, 101-111.
- **Montgomery, T.D., Wes Leid, R., Wescott, R.B.,** 1986. Interaction of bovine complement with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 19, 55-65.
- **Morales, M.A., Luego, J., Vasquez, J.,** 2000. Distribución y tendencia de la fasciolosis en ganado de abasto en Chile, 1989-1995. *Parasitol. al día* 24, 115-118.
- **Morphew, R.M., Wright, H.A., LaCourse, E.J., Woods, D.J., Brophy, P.M.,** 2007. Comparative Proteomics of Excretory-Secretory Proteins Released by the Liver Fluke *Fasciola hepatica* in Sheep Host Bile and during in Vitro Culture ex Host. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 963-972.
- **Morphew, R.M., Hamilton, C.M., Wright, H.A., Dowling, D.J., O'Neill, S.M., Brophy, P.M.,** 2013. Identification of the major proteins of an immune modulating fraction from adult *Fasciola hepatica* released by Nonidet P40. *Vet. Parasitol.* 191, 379-85.

- **Morphew, R.M., MacKintosh, N., Hart, E.H., Prescott, M., LaCourse, E.J., Brophy, P.M.,** 2014. In vitro biomarker discovery in the parasitic flatworm *Fasciola hepatica* for monitoring chemotherapeutic treatment. *EuPA Open Proteomics* 3, 85-99.
- **Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L.,** 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348-57.
- **Mosmann, T.R., Coffman, R.L.,** 1989a. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173.
- **Mosmann, T.R., Coffman, R.L.,** 1989b. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.* 46, 111-47.
- **Mosser, D.M.,** 2003. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73, 209-12.
- **Mowen, K.A., Glimcher, L.H.,** 2004. Signaling pathways in Th2 development. *Immunol. Rev.* 202, 203-222.
- **Moxon, J. V., LaCourse, E.J., Wright, H.A., Perally, S., Prescott, M.C., Gillard, J.L., Barrett, J., Hamilton, J. V., Brophy, P.M.,** 2010. Proteomic analysis of embryonic *Fasciola hepatica*: Characterization and antigenic potential of a developmentally regulated heat shock protein. *Vet. Parasitol.* 169, 62-75.
- **Mulcahy, G., O'Connor, F., McGonigle, S., Dowd, A., Clery, D.G., Andrews, S.J., Dalton, J.P.,** 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16, 932-939.
- **Mulcahy, G., O'Connor, F., Clery, D., Hogan, S.F., Dowd, A.J., Andrews, S.J., Dalton, J.P.,** 1999. Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Res. Vet. Sci.*
- **Murray, P.J., Wynn, T.A.,** 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 723-737.
- **Musoke, A., Rurangirwa, F., Nantulya, V.,** 1986. Biological properties of bovine immunoglobulins and systemic antibody responses. En: W.I., M. (Ed.), *The ruminant immune system in health and disease*. University Press, Cambridge, (U.K.), pp. 391-408.

- **Nacy, C.A., James, S.L., Benjamin, W.R., Farrar, J.J., Hockmeyer, W.T., Meltzer, M.S.**, 1983. Activation of macrophages for microbicidal and tumoricidal effector functions by soluble factors from EL-4, a continuous T cell line. *Infect. Immun.* 40, 820-4.
- **Nair, M.G., Cochrane, D.W., Allen, J.E.**, 2003. Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro. *Immunol. Lett.* 85, 173-180.
- **Napoletano, C., Mattiucci, S., Colantoni, A., Battisti, F., Zizzari, I.G., Rahimi, H., Nuti, M., Rughetti, A.**, 2018. *Anisakis pegreffii* impacts differentiation and function of human dendritic cells. *Parasite Immunol.* 40, e12527.
- **Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., Rubin, B.Y.**, 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158, 670-89.
- **Navarro, J.A., Caro, M.R., Seva, J., Rosillo, M.C., Gomez, M.A., Gallego, M.C.**, 1996. Study of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and secondary lymphoid organs in the goat using monoclonal antibodies to surface markers of bovine lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51, 147-56.
- **Nelson, B.J., Ralph, P., Green, S.J., Nacy, C.A.**, 1991. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor-beta 1. *J. Immunol.* 146, 1849-57.
- **Nguyen, T.G.T., Le, T.H., Dao, T.H.T., Tran, T.L.H., Praet, N., Speybroeck, N., Vercruysse, J., Dorny, P.**, 2011. Bovine fasciolosis in the human fasciolosis hyperendemic Binh Dinh province in Central Vietnam. *Acta Trop.* 117, 19-22.
- **North, R.J.**, 1978. The concept of the activated macrophage. *J. Immunol.* 121, 806-9.
- **Norton, A.J., Isaacson, P.G.**, 1987. Detailed phenotypic analysis of B-cell lymphoma using a panel of antibodies reactive in routinely fixed wax-embedded tissue. *Am. J. Pathol.* 128, 225-40.

- **Novick, D., Kim, S.-H., Fantuzzi, G., Reznikov, L.L., Dinarello, C.A., Rubinstein, M.,** 1999. Interleukin-18 Binding Protein: A Novel Modulator of the Th1 Cytokine Response. *Immunity* 10, 127-136.
- **Nutman, T.B.,** 2013. Immune responses in helminth infections. En: Lee J.J., Rosenberg, H.F. (Ed.), *Eosinophils in health and disease*. Academic Press, Waltham., p. 312-320.
- **Odenthal, M., Neubauer, K., Meyer zum Büschenfelde, K.H., Ramadori, G.,** 1993. Localization of mRNA steady-state level of cellular fibronectin in rat liver undergoing a CCL4-induced acute damage or fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1181, 266-272.
- **Ohnmacht, C., Pullner, A., van Rooijen, N., Voehringer, D.,** 2007. Analysis of eosinophil turnover in vivo reveals their active recruitment to and prolonged survival in the peritoneal cavity. *J. Immunol.* 179, 4766-74.
- **Olivar, R., Luque, A., Naranjo-Gomez, M., Quer, J., Garcia de Frutos, P., Borrás, F.E., Rodríguez de Córdoba, S., Blom, A.M., Aran, J.M.,** 2013. The $\alpha 7\beta 0$ Isoform of the Complement Regulator C4b-Binding Protein Induces a Semimature, Anti-Inflammatory State in Dendritic Cells. *J. Immunol.* 190, 2857-2872.
- **O'Neill, S.M., Brady, M.T., Callanan, J.J., Mulcahy, G., Joyce, P., Mills, K.H.G., Dalton, J.P.,** 2000. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol.* 22, 147-155.
- **O'Neill, S.M., Mills, K.H., Dalton, J.P.,** 2001. *Fasciola hepatica* cathepsin L cysteine proteinase suppresses Bordetella pertussis-specific interferon-gamma production in vivo. *Parasite Immunol.* 23, 541-7.
- **Oshiro, T.M., Macedo, M.S., Macedo-Soares, M.F.,** 2005. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm. Res.* 54, 17-21.
- **Owhashi, M., Arita, H., Hayai, N.,** 2000. Identification of a novel eosinophil chemotactic cytokine (ECF-L) as a chitinase family protein. *J. Biol. Chem.* 275, 1279-86.
- **Pace, J.L., Russell, S.W., Torres, B.A., Johnson, H.M., Gray, P.W.,** 1983. Recombinant mouse gamma interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. *J. Immunol.* 130, 2011-3.

- **Pacheco, I.L., Abril, N., Morales-Prieto, N., Bautista, M.J., Zafra, R., Escamilla, A., Ruiz, M.T., Martínez-Moreno, A., Pérez, J., 2017.** Th1/Th2 balance in the liver and hepatic lymph nodes of vaccinated and unvaccinated sheep during acute stages of infection with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 238, 61-65.
- **Paik, Y., Schwabe, R.F., Bataller, R., Russo, M.P., Jobin, C., Brenner, D.A., 2003.** Toll-Like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 37, 1043-1055.
- **Pang, D.J., Neves, J.F., Sumaria, N., Pennington, D.J., 2012.** Understanding the complexity of $\gamma\delta$ T-cell subsets in mouse and human. *Immunology* 136, 283-290.
- **Park, C.-S., Yoon, S.-O., Armitage, R.J., Choi, Y.S., 2004.** Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *J. Immunol.* 173, 6676-83.
- **Parkinson, J., Blaxter, M., 2009.** Expressed sequence tags: an overview. *Methods Mol. Biol.* 533, 1-12.
- **Parulekar, A.D., Atik, M.A., Hanania, N.A., 2014.** Periostin, a novel biomarker of TH2-driven asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 20, 60-65.
- **Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Pedreira, J., Arias, M., López, C., Panadero, R., Díaz, P., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2003.** Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitol. Res.* 91, 328-331.
- **Pearce, E.J., Sher, A., 1991.** Functional dichotomy in the CD4⁺ T cell response to *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 73, 110-6.
- **Pérez, J., Martín de las Mulas, J., Chacón-M. De Lara, F., Gutierrez-Palomino, P., Becerra-Martel, C., Martínez-Moreno, A., 1998.** Immunohistochemical study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in primarily and secondarily infected goats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64, 337-348.
- **Pérez, J., Martín De Las Mulas, J., Carrasco, L., Gutierrez, P.N., Martínez-Cruz, M.S., Martínez-Moreno, A., 1999.** Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes in goats infected with one or more doses of *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* 120, 199-210.
- **Pérez, J., Ortega, J., Moreno, T., Morrondo, P., López-Sández, C., Martínez-Moreno, A., 2002.** Pathological and Immunohistochemical Study of the

Liver and Hepatic Lymph Nodes of Sheep Chronically Reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without Triclabendazole Treatment. J. Comp. Pathol. 127, 30-36.

- **Pérez, J., García, P.M., Hernández, S., Mozos, E., Cámara, S., Martínez-Moreno, A.,** 2003. Experimental haemonchosis in goats: effects of single and multiple infections in the host response. Vet. Parasitol. 111, 333-42.
- **Pérez-Creo, A., Díaz, P., López, C., Béjar, J.P., Martínez-Sernández, V., Panadero, R., Díez-Baños, P., Ubeira, F.M., Morrondo, P.,** 2016. *Fasciola hepatica* in goats from north-western Spain: Risk factor analysis using a capture ELISA. Vet. J. 208, 104-105.
- **Perona-Wright, G., Jenkins, S.J., MacDonald, A.S.,** 2006. Dendritic cell activation and function in response to *Schistosoma mansoni*. Int. J. Parasitol. 36, 711-721.
- **Pfaffl, M.W.,** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29, 45e-45.
- **Piedrafita, D., Parsons, J.C., Sandeman, R.M., Wood, P.R., Estuningsih, S.E., Partoutomo, S., Spithill, T.W.,** 2001. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* in vitro is mediated by reactive nitrogen intermediates. Parasite Immunol. 23, 473-482.
- **Piedrafita, D., Estuningsih, E., Pleasance, J., Prowse, R., Raadsma, H.W., Meeusen, E.N.T., Spithill, T.W.,** 2007. Peritoneal Lavage Cells of Indonesian Thin-Tail Sheep Mediate Antibody-Dependent Superoxide Radical Cytotoxicity In Vitro against Newly Excysted Juvenile *Fasciola gigantica* but Not Juvenile *Fasciola hepatica*. Infect. Immun. 75, 1954-1963.
- **Piedrafita, D., Spithill, T.W., Smith, R.E., Raadsma, H.W.,** 2010. Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. Parasite Immunol. 32, 572-581.
-
- **Pinczowski, P., Sanjosé, L., Gimeno, M., Crespo, H., Glaria, I., Amorena, B., de Andrés, D., Pérez, M., Reina, R., Luján, L.,** 2017. Small Ruminant Lentiviruses in Sheep: Pathology and Tropism of 2 Strains Using the Bone Marrow Route. Vet. Pathol. 54, 413-424.

- **Pleasance, J., Wiedosari, E., Raadsma, H.W., Meeusen, E., Piedrafita, D.,** 2011. Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response. *Parasite Immunol.* 33, 495-505.
- **Poelchau, M., Childers, C., Moore, G., Tsavatapalli, V., Evans, J., Lee, C.Y., Lin, H., Lin, J.W., Hackett, K.,** 2015. The i5k Workspace@NAL--enabling genomic data access, visualization and curation of arthropod genomes. *Nucleic Acids Res.* 43, D714-9.
- **Poglayen G., Capelli, G., Martini, M., Zampiccoli, R.,** 1995. Epidemiologia delle parassitosi dell'aparato digerente del bovine nella provincia autónoma di Trento. *Atti della Soc. Ital. di Buitraia* 27, 483-489.
- **Poitou, I., Baeza, E., Boulard, C.,** 1992. Humoral and cellular immune responses in rats during a primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 45, 59-71.
- **Poitou, I., Baeza, E., Boulard, C.,** 1993. Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 49, 179-190.
- **Poitou, I., Baeza, E., Boulard, C.,** 1993. analysis of the results obtained using a technic of experimental primary infestation with *Fasciola hepatica* in the rat. *InternarionolJournalfor Parasitol.* 23, 403-406.
- **Price, C.W., Leslie, D.C., Landers, J.P.,** 2009. Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. *Lab Chip* 9, 2484.
- **Prussin, C., Metcalfe, D.D.,** 2003. 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, S486-94.
- **Pugin, J., Heumann, D., Tomasz, A., Kravchenko, V. V., Akamatsu, Y., Nishijima, M., Glauser, M.P., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J.,** 1994. CD14 Is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1, 509-516.
- **Pulendran, B., Tang, H., Manicassamy, S.,** 2010. Programming dendritic cells to induce TH2 and tolerogenic responses. *Nat. Immunol.* 11.
- **Qin, P., Tang, X., Elloso, M.M., Harnish, D.C.,** 2006. Bile acids induce adhesion molecule expression in endothelial cells through activation of reactive oxygen species, NF-κB, and p38. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 291, H741-H747.

- **Raadsma, H.W., Kingsford, N.M., Suharyanta, Spithill, T.W., Piedrafita, D.,** 2007. Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep. *Vet. Parasitol.* 143, 275-286.
- **Raadsma, H.W., Kingsford, N.M., Suharyanta, Spithill, T.W., Piedrafita, D.,** 2008. Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* in Merino sheep: II. Development of a predictive index for *Fasciola gigantica* worm burden. *Vet. Parasitol.* 154, 250-261.
- **Ramalho-Pinto, F.J., McLaren, D.J., Smithers, S.R.,** 1978. Complement-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils in vitro. *J. Exp. Med.* 147, 147-56.
- **Randolph, G.J., Jakubzick, C., Qu, C.,** 2008. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 52-60.
- **Reddington, J.J., Leid, R.W., Wescott, R.B.,** 1986. The susceptibility of the goat to *Fasciola hepatica* infections. *Vet. Parasitol.* 19, 145-50.
- **Reece, J.J., Siracusa, M.C., Scott, A.L.,** 2006. Innate immune responses to lung-stage helminth infection induce alternatively activated alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 74, 4970-81.
- **Reese, J.T., Childers, C.P., Sundaram, J.P., Dickens, C.M., Childs, K.L., Vile, D.C., Elsik, C.G.,** 2010. Bovine Genome Database: supporting community annotation and analysis of the *Bos taurus* genome. *BMC Genomics* 11, 645.
- **Reese, T.A., Liang, H.-E., Tager, A.M., Luster, A.D., Van Rooijen, N., Voehringer, D., Locksley, R.M.,** 2007. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* 447, 92-96.
- **Reimert, C.M., Fitzsimmons, C.M., Joseph, S., Mwatha, J.K., Jones, F.M., Kimani, G., Hoffmann, K.F., Booth, M., Kabatereine, N.B., Dunne, D.W., Vennervald, B.J.,** 2006. Eosinophil activity in *Schistosoma mansoni* infections in vivo and in vitro in relation to plasma cytokine profile pre- and posttreatment with praziquantel. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 584-93.
- **Rescan, P.Y., Loréal, O., Hassell, J.R., Yamada, Y., Guillouzo, A., Clément, B.,** 1993. Distribution and origin of the basement membrane component perlecan in rat liver and primary hepatocyte culture. *Am. J. Pathol.* 142, 199-208.

- **Reuter, J.A., Spacek, D. V., Snyder, M.P.,** 2015. High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol. Cell* 58, 586-597.
- **Riener, M.-O., Fritzsche, F.R., Soll, C., Pestalozzi, B.C., Probst-Hensch, N., Clavien, P.-A., Jochum, W., Soltermann, A., Moch, H., Kristiansen, G.,** 2010. Expression of the extracellular matrix protein periostin in liver tumours and bile duct carcinomas. *Histopathology* 56, 600-606.
- **Rinaldi, L., Biggeri, A., Musella, V., De Waal, T., Hertzberg, H., Mavrot, F., Torgerson, P.R., Selemetas, N., Coll, T., Bosco, A., Grisotto, L., Cringoli, G., Catelan, D.,** 2015. Sheep and *Fasciola hepatica* in Europe: the GLOWORM experience. *Geospat. Health* 9, 309.
- **Rioux, M.-C., Carmona, C., Acosta, D., Ward, B., Ndao, M., Gibbs, B.F., Bennett, H.P., Spithill, T.W.,** 2008. Discovery and validation of serum biomarkers expressed over the first twelve weeks of *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Int. J. Parasitol.* 38, 123-136.
- **Robinson, M.W., Menon, R., Donnelly, S.M., Dalton, J.P., Ranganathan, S.,** 2009. An Integrated Transcriptomics and Proteomics Analysis of the Secretome of the Helminth Pathogen *Fasciola hepatica*. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 1891-1907.
- **Robinson, M.W., Corvo, I., Jones, P.M., George, A.M., Padula, M.P., To, J., Cancela, M., Rinaldi, G., Tort, J.F., Roche, L., Dalton, J.P.,** 2011. Collagenolytic Activities of the Major Secreted Cathepsin L Peptidases Involved in the Virulence of the Helminth Pathogen, *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1012.
- **Robinson, M.W., Dalton, J.P., O'Brien, B.A., Donnelly, S.,** 2013. *Fasciola hepatica*: The therapeutic potential of a worm secretome. *Int. J. Parasitol.* 43, 283-291.
- **Rodríguez, E., Noya, V., Cervi, L., Chiribao, M.L., Brossard, N., Chiale, C., Carmona, C., Giacomini, C., Freire, T.,** 2015. Glycans from *Fasciola hepatica* Modulate the Host Immune Response and TLR-Induced Maturation of Dendritic Cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0004234.
- **Rodríguez-Sosa, M., Satoskar, A.R., Calderón, R., Gomez-Garcia, L., Saavedra, R., Bojalil, R., Terrazas, L.I.,** 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect. Immun.* 70, 3656-64.
- **Roitt, I.,** 2001. *Essential Immunology*, 10th ed. Blackwell Science Inc., USA.

- **Rojas-Caraballo, J., López-Abán, J., Fernández-Soto, P., Vicente, B., Collía, F., Muro, A.,** 2015. Gene Expression Profile in the Liver of BALB/c Mice Infected with *Fasciola hepatica*. PLoS One 10, e0134910.
- **Rojas-Caraballo, J., López-Abán, J., Moreno-Pérez, D.A., Vicente, B., Fernández-Soto, P., Del Olmo, E., Patarroyo, M.A., Muro, A.,** 2017. Transcriptome profiling of gene expression during immunisation trial against *Fasciola hepatica*: identification of genes and pathways involved in conferring immunoprotection in a murine model. BMC Infect. Dis. 17, 94.
- **Rojo-Vázquez F.A., Ferre Pérez, I.,** 1999. Fasciolosis. En: Cordero del Campillo, M. y Rojo-Vázquez, F.A. Parasitología Veterinaria. McGraw Hill Interamericana, Madrid, pp. 260-272.
- **Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F., Martínez-Valladares, M.,** 2012. Update on trematode infections in sheep. Vet. Parasitol. 189: 15-38.
- **Ross, J.G., Dow, C., Todd, J.R.,** 1967. A study of *Fasciola hepatica* infections in sheep. Vet. Rec. 80, 543-6.
- **Rosselli-Murai, L.K., Almeida, L.O., Zagni, C., Galindo-Moreno, P., Padial-Molina, M., Volk, S.L., Murai, M.J., Rios, H.F., Squarize, C.H., Castilho, R.M.,** 2013. Periostin Responds to Mechanical Stress and Tension by Activating the MTOR Signaling Pathway. PLoS One 8, e83580.
- **Rühl, M., Sahin, E., Johannsen, M., Somasundaram, R., Manski, D., Riecken, E.O., Schuppan, D.,** 1999. Soluble collagen VI drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of Bax. J. Biol. Chem. 274, 34361-8.
- **Ruiz-Campillo, M.T., Molina Hernandez, V., Escamilla, A., Stevenson, M., Pérez, J., Martínez-Moreno, A., Donnelly, S., Dalton, J.P., Cwiklinski, K.,** 2017. Immune signatures of pathogenesis in the peritoneal compartment during early infection of sheep with *Fasciola hepatica*. Sci. Rep. 7, 2782.
- **Rushton, B.,** 1977. Ovine fascioliasis following reinfection. Res. Vet. Sci. 22, 133-4.
- **Rushton, B., Murray, M.,** 1977. Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep. J. Comp. Pathol. 87, 459-470.

- **Rutherford, M.S., Witsell, A., Schook, L.B.**, 1993. Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *J. Leukoc. Biol.* 53, 602-618.
- **Saito, K., Suter, E.**, 1965. Lysosomal acid hydrolases in mice infected with BCG. *J. Exp. Med.* 121, 727-38.
- **Salimi-Bejestani, M.R., McGarry, J.W., Felstead, S., Ortiz, P., Akca, A., Williams, D.J.L.**, 2005. Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Res. Vet. Sci.* 78, 177-181.
- **Sanabria, R., Ceballos, L., Moreno, L., Romero, J., Lanusse, C., Alvarez, L.**, 2013. Identification of a field isolate of *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and susceptible to triclabendazole. *Vet. Parasitol.* 193, 105-110.
- **Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J.L., Panadero, R., Pedreira, J., López, C., Díez-Baños, P., Morrondo, P.**, 2002. Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). *Vet. Res. Commun.* 26, 361-70.
- **Sandeman, R.M., Howell, M.J.**, 1981. Response of sheep to challenge infection with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* 30, 294-7.
- **Sandler, N.G., Mentink-Kane, M.M., Cheever, A.W., Wynn, T.A.**, 2003. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J. Immunol.* 171, 3655-67.
- **Scherp, P., Ku, G., Coleman, L., Kheterpal, I.**, 2011. Gel-Based and Gel-Free Proteomic Technologies. En: *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). pp. 163-190.
- **Scholler, N., Hayden-Ledbetter, M., Hellström, K.E., Hellström, I., Ledbetter, J.A.**, 2001. CD83 is an I-type lectin adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8+ T cells [corrected]. *J. Immunol.* 166, 3865-72.
- **Schreiber, R.D.**, 1984. Identification of gamma-interferon as a murine macrophage-activating factor for tumor cytotoxicity. *Contemp. Top. Immunobiol.* 13, 171-98.

- **Schuppan, D., Ruehl, M., Somasundaram, R., Hahn, E.G.,** 2001. Matrix as a Modulator of Hepatic Fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.* 21, 351-372.
- **Schweizer, G., Braun, U., Deplazes, P., Torgerson, P.R.,** 2005. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet. Rec.* 157, 188-93.
- **Sehra, S., Yao, W., Nguyen, E.T., Ahyi, A.-N.N., Tuana, F.M.B., Ahlfeld, S.K., Snider, P., Tepper, R.S., Petrache, I., Conway, S.J., Kaplan, M.H.,** 2011. Periostin regulates goblet cell metaplasia in a model of allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 186, 4959-66.
- **Serradell, M.C., Guasconi, L., Cervi, L., Chiapello, L.S., Masih, D.T.,** 2007. Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 197-208.
- **Sibille, P., Tliba, O., Boulard, C.,** 2004. Early and transient cytotoxic response of peritoneal cells from *Fasciola hepatica*-infected rats. *573 Vet. Res* 35, 573-584.
- **Sidhu, S.S., Yuan, S., Innes, A.L., Kerr, S., Woodruff, P.G., Hou, L., Muller, S.J., Fahy, J.V.,** 2010. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14170-5.
- **Simmons, D., Tan, S., Tenen, D., Nicholson-Weller, A., Seed, B.,** 1989. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 73.
- **Sinclair, K.B.,** 1962. Observations on the clinical pathology of ovine fascioliasis. *Brit. vet. J* 118.
- **Sinclair, K.B.,** 1967. Pathogenesis of *Fasciola* and the other liver-flukes. *Helminthol. Abst.* 3, 115-134.
- **Sinclair, K.B.,** 1968. The effect of corticosteroid on the plasma protein of lambs infected with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* 9, 181-3.
- **Sinclair, K.B.,** 1970. The Pathogenicity of *Fasciola hepatica* in previously infected, corticosteroid-treated lambs. *Br. Vet. J.* 127, 125-136.
- **Smith, A.M., Dowd, A.J., Heffernan, M., Robertson, C.D., Dalton, J.P.,** 1993. *Fasciola hepatica*: A secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin. *Int. J. Parasitol.* 23, 977-983.

- **Smith, N.C., Ovington, K.S., Boray, J.C.,** 1992. *Fasciola hepatica*: Free radical generation by peritoneal leukocytes in challenged rodents. *Int. J. Parasitol.* 22, 281-286.
- **Sokol, C.L., Barton, G.M., Farr, A.G., Medzhitov, R.,** 2008. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat. Immunol.* 9, 310-318.
- **Soler, G.,** 2015. Arginasa, un enzima clave en el destino de la respuesta inmune. *SEBBM divulgación la ciencia al alcance de la mano*, 29.
- **Sorribes J., Aubary M.J., Bargues, M.D., y cols.,** 1990. Revisión de los casos humanos de Fascioliasis en España entre los años 1970 y 1989. En: Congreso de Zoonosis, 1o Interautonómico, Reunión de la International Zoonoses Association (IZA). Valencia, (Spain).
- **Stadecker, M.J.,** 1999. The regulatory role of the antigen-presenting cell in the development of hepatic immunopathology during infection with *Schistosoma mansoni*. *Pathobiology* 67, 269-72.
- **Steeg, P.S., Moore, R.N., Johnson, H.M., Oppenheim, J.J.,** 1982. Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by a lymphokine with immune interferon activity. *J. Exp. Med.* 156, 1780-93.
- **Steel, C., Nutman, T.B., Nair, M.G., Maizels, R.M., Allen, J.E.,** 1993. Regulation of IL-5 in onchocerciasis. A critical role for IL-2. *J. Immunol.* 150, 5511-8.
- **Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S.,** 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176, 287-92.
- **Stout, R.D.,** 1993. Macrophage activation by T cells: cognate and non-cognate signals. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 398-403.
- **Stout, R.D., Suttles, J.,** 1997. T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease. *Front. Biosci.* 2, d197-206.
- **Stout, R.D., Suttles, J.,** 2004. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* 76, 509-13.

- **Sun, M., Zhou, G., Lee, S., Chen, J., Shi, R.Z., Wang, S.M.,** 2004. SAGE is far more sensitive than EST for detecting low-abundance transcripts. *BMC Genomics* 5, 1.
- **Svedersky, L.P., Benton, C. V, Berger, W.H., Rinderknecht, E., Harkins, R.N., Palladino, M.A.,** 1984. Biological and antigenic similarities of murine interferon-gamma and macrophage-activating factor. *J. Exp. Med.* 159, 812-27.
- **Sykes, A.R., Coop, R., Rushton, B.,** 1980. Chronic subclinical fascioliasis in sheep: effects on food intake, food utilisation and blood constituents. *Res. Vet. Sci.* 28, 63-70.
- **Symons, L.E.A.,** 1989. Pathophysiology of endoparasitic infection compared with ectoparasitic infestation and microbial infection. *Pathophysiol. endoparasitic Infect. Comp. with ectoparasitic Infest. Microb. Infect.*
- **Takayama, G., Arima, K., Kanaji, T., Toda, S., Tanaka, H., Shoji, S., McKenzie, A.N.J., Nagai, H., Hotokebuchi, T., Izuhara, K.,** 2006. Periostin: A novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 98-104.
- **Tartibi, H.M., Bahna, S.L.,** 2014. Clinical and biological markers of asthma control. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 10, 1453-1461.
- **Taylor, R.C., Richmond, P., Upham, J.W.,** 2006. Toll-like receptor 2 ligands inhibit Th2 responses to mite allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 1148-54.
- **Terrazas, C., de Dios Ruiz-Rosado, J., Amici, S.A., Jablonski, K.A., Martinez-Saucedo, D., Webb, L.M., Cortado, H., Robledo-Avila, F., Oghumu, S., Satoskar, A.R., Rodriguez-Sosa, M., Terrazas, L.I., Guerau-de-Arellano, M., Partida-Sánchez, S.,** 2017. Helminth-induced Ly6Chi monocyte-derived alternatively activated macrophages suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Sci. Rep.* 7, 40814.
- **Terrazas, L.I., Montero, D., Terrazas, C.A., Reyes, J.L., Rodríguez-Sosa, M.,** 2005. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int. J. Parasitol.* 35, 1349-1358.
- **Terrazas, L.I., Walsh, K.L., Piskorska, D., McGuire, E., Harn, D.A.,** 2001. The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete

anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J. Immunol.* 167, 5294-303.

- **Tizard, I.**, 2012. *Veterinary Immunology.*, 9th ed. Saunders.
- **Tliba, O., Chauvin, A., Le Vern, Y., Boulard, C., Sibille, P.**, 2002. Evaluation of the hepatic NK cell response during the early phase of *Fasciola hepatica* infection in rats. *Vet. Res.* 33, 327-332.
- **Toet, H., Piedrafita, D.M., Spithill, T.W.**, 2014. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int. J. Parasitol.* 44, 915-927.
- **Torgerson P., Claxton, J.**, 1999. Epidemiology and control. En: J.P., D. (Ed.), *Fasciolosis*. CABI Publishing, pp. 113-149.
- **Trinchieri, G.**, 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 133-146.
- **Trudgett, A., Watt, A.P., Harriott, P., Ennis, M.**, 2003. Liver fluke (*Fasciola hepatica*)-derived peptides activate rat peritoneal mast cells. *Int. Immunopharmacol.* 3, 775-781.
- **Tsunawaki, S., Sporn, M., Ding, A., Nathan, C.**, 1988. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . *Nature* 334, 260-262.
- **Tundup, S., Srivastava, L., Nagy, T., Harn, D.**, 2014. CD14 Influences Host Immune Responses and Alternative Activation of Macrophages during *Schistosoma mansoni* Infection. *Infect Immun.* 82, 3240-3251.
- **Turpin J.A., López-Berestein G.**, 1993. Differentiation, maturation and activation of monocytes and macrophages: functional activity is controlled by a continuum of maturation. En: López-Berestein, G., Klotergaard, J., *Mononuclear Phagocytes in Cell Biology*. CRC Press, pp 71-89.
- **Turrientes, M.C., de Sta S, M.A., Ceballos, E., Díaz, M., Bareno, M., Muro A., Pardo, J., López-Vélez, R.**, 2004. Fasciolosis importada y autóctona. *Enfermedades Emergentes* 6, 188.
- **Uemura, K., Saka, M., Nakagawa, T., Kawasaki, N., Thiel, S., Jensenius, J.C., Kawasaki, T.**, 2002. L-MBP is expressed in epithelial cells of mouse small intestine. *J. Immunol.* 169, 6945-50.

- **Ulevitch, R.J., Tobias, P.S.,** 1995. Receptor-Dependent Mechanisms of Cell Stimulation by Bacterial Endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 437-457.
- **Unanue, E.R.,** 1984. Antigen-Presenting Function of the Macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* 2, 395-428.
- **Underhill, D.M., Ozinsky, A.,** 2002. phagocytosis of microbes : Complexity in Action. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 825-852.
- **Urquhart, G.M.,** 1956. The pathology of experimental fascioliasis in the rabbit. *J. Pathol. Bacteriol.* 71, 301-310.
- **Valheim, M., Sigurðardóttir, Ó.G., Storset, A.K., Aune, L.G., Press, C.M.,** 2004. Characterization of Macrophages and Occurrence of T cells in Intestinal Lesions of Subclinical Paratuberculosis in Goats. *J. Comp. Pathol.* 131, 221-232.
- **van Dijk, J., Sargison, N.D., Kenyon, F., Skuce, P.J.,** 2010. Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperate regions. *animal* 4, 377-392.
-
- **Van Milligen, F.J., Cornelissen, J.B., Hendriks, I.M., Gaasenbeek, C.P., Bokhout, B.A.,** 1998. Protection of *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG1 and IgG2a antibodies around the parasites. *Parasite Immunol.* 20, 285-92.
- **Van Milligen, F.J., Cornelissen, Jan, B.W.J., Bokhout, B.A.,** 1999. Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite Immunol.* 21, 243-251.
- **Van Nierop, K., de Groot, C.,** 2002. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin. Immunol.* 14, 251-7.
- **Van Riet, E., Hartgers, F.C., Yazdanbakhsh, M.,** 2007. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology* 212, 475-490.
- **Vázquez, M.B., Sureda, M., Rebollo, J.,** 2012. Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología* 31, 21-30.

- **Vengušt, G., Klinkon, M., Bidovec, A., Vengušt, A.,** 2003. *Fasciola hepatica*: effects on blood constituents and liver minerals in fallow deer (*Dama dama*). Vet. Parasitol. 112, 51-61.
- **Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., y cols.,** 2001. The Sequence of the Human Genome. Science (80-). 291, 1304-1351.
- **VerHague, M.A., Cheng, D., Weinberg, R.B., Shelness, G.S.,** 2013. Apolipoprotein A-IV Expression in Mouse Liver Enhances Triglyceride Secretion and Reduces Hepatic Lipid Content by Promoting Very Low Density Lipoprotein Particle ExpansionSignificance. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 33, 2501-2508.
- **Vignali, D.A., Bickle, Q.D., Taylor, M.G., Tennent, G., Pepys, M.B.,** 1988. Comparison of the role of complement in immunity to *Schistosoma mansoni* in rats and mice. Immunology 63, 55-61.
- **Villa-Mancera, A., Méndez-Mendoza, M.,** 2012. Protection and antibody isotype responses against *Fasciola hepatica* with specific antibody to pIII-displayed peptide mimotopes of cathepsin L1 in sheep. Vet. J. 194, 108-112.
- **Villa-Mancera, A., Reynoso-Palomar, A., Utrera-Quintana, F., Carreón-Luna, L.,** 2014. Cathepsin L1 mimotopes with adjuvant Quil A induces a Th1/Th2 immune response and confers significant protection against *Fasciola hepatica* infection in goats. Parasitol. Res. 113, 243-250.
- **Voehringer, D., van Rooijen, N., Locksley, R.M.,** 2007. Eosinophils develop in distinct stages and are recruited to peripheral sites by alternatively activated macrophages. J. Leukoc. Biol. 81, 1434-1444.
- **Vogel, P., Janke, L., Gravano, D.M., Lu, M., Sawant, D. V., Bush, D., Shuyu, E., Vignali, D.A.A., Pillai, A., Rehg, J.E.,** 2018. Globule Leukocytes and Other Mast Cells in the Mouse Intestine. Vet. Pathol. 55, 76-97.
- **Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., Girkontaite, I.,** 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. Nature 390, 350-351.
- **Vukman, K. V., Adams, P.N., Dowling, D., Metz, M., Maurer, M., O'Neill, S.M.,** 2013. The effects of *Fasciola hepatica* tegumental antigens on mast cell function. Int. J. Parasitol. 43, 531-539.

- **Walsh, K.P., Brady, M.T., Finlay, C.M., Boon, L., Mills, K.H.G., 2009.** Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses. *J. Immunol.* 183, 1577-86.
- **Wang, H.Y., Lin, C.Y., Chien, C.C., Kan, W.C., Tian, Y.F., Liao, P.C., Wu, H.Y., Su, S.B., 2012.** Impact of uremic environment on peritoneum: A proteomic view. *J. Proteomics* 75, 2053-2063.
- **Wang, N., Liang, H., Zen, K., 2014.** Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front. Immunol.* 5, 614.
- **Welch, J.S., Escoubet-Lozach, L., Sykes, D.B., Liddiard, K., Greaves, D.R., Glass, C.K., 2002.** Th2 Cytokines and Allergic Challenge Induce Ym1 Expression in Macrophages by a STAT6-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 277, 42821-42829.
- **Wesołowska, A., Jaros, S., Norbury, L.J., Jaros, D., Zygnier, W., Wędrychowicz, H., 2013.** Microarray analysis of rat immune responses to liver fluke infection following vaccination with *Fasciola hepatica* phosphoglycerate kinase. *Exp. Parasitol.* 134, 33-38.
- **Wicki, P., Schwalbach, B., Charbon, J.L., Steiner, A., Lang, M., Loup, F., Pfister, K., 1991.** Intestinal cellular reaction of cattle after infection by *Fasciola hepatica*. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 133, 429-37.
- **Williams, D.L., Sayed, A.A., Bernier, J., Birkeland, S.R., Cipriano, M.J., Papa, A.R., McArthur, A.G., Taft, A., Vermeire, J.J., Yoshino, T.P., 2007.** Profiling *Schistosoma mansoni* development using serial analysis of gene expression (SAGE). *Exp. Parasitol.* 117, 246-258.
- **Wilson, R.A., Wright, J.M., De Castro-Borges, W., Parker-Manuel, S.J., Dowle, A.A., Ashton, P.D., Young, N.D., Gasser, R.B., Spithill, T.W., 2011.** Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome.
- **Wood, C.E., Chen, G.-F., Keller-Wood, M., 2005.** Expression of nitric oxide synthase isoforms is reduced in late-gestation ovine fetal brainstem. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 289, R613-R619.
- **Wyatt, C.R., Madruga, C., Cluff, C., Parish, S., Hamilton, M.J., Goff, W., Davis, W.C., 1994.** Differential distribution of gamma delta T-cell receptor

lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 40, 187-99.

- **Yamasaki, H., Kominami, E., Aoki, T.,** 1992. Immunocytochemical localization of a cysteine protease in adult worms of the liver fluke *Fasciola sp.* *Parasitol. Res.* 78, 574-80.
- **Yarmush, M.L., Jayaraman, A.,** 2002. advances in proteomic technologies. *Annu. Rev. Biomed. Eng* 4, 349-73.
- **Young, N.D., Hall, R.S., Jex, A.R., Cantacessi, C., Gasser, R.B.,** 2010. Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica* — A key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite. *Biotechnol. Adv.* 28, 222-231.
- **Zafra, R., Buffoni, L., Martínez-Moreno, A., Pérez-Écija, A., Martínez-Moreno, F.J., Pérez, J.,** 2008. A Study of the Liver of Goats Immunized with a Synthetic Peptide of the Sm14 Antigen and Challenged with *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* 139, 169-176.
- **Zafra, R., Pérez-Écija, R.A., Buffoni, L., Mendes, R.E., Martínez-Moreno, A., Martínez-Moreno, F.J., Martínez Galisteo, M.E., Pérez, J.,** 2010. Evaluation of Hepatic Damage and Local Immune Response in Goats Immunized with Native Glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* 143, 110-119.
- **Zafra, R., Pérez-Écija, R.A., Buffoni, L., Moreno, P., Bautista, M.J., Martínez-Moreno, A., Mulcahy, G., Dalton, J.P., Pérez, J.,** 2013a. Early and Late Peritoneal and Hepatic Changes in Goats Immunized with Recombinant Cathepsin L1 and Infected with *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* 148, 373-384.
- **Zafra, R., Pérez, J., Buffoni, L., Martínez-Moreno, F.J., Acosta, I., Mozos, E., Martínez-Moreno, A.,** 2013b. Peripheral blood lymphocyte subsets in *Fasciola hepatica* infected and immunised goats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 155, 135-138.
- **Zawistowska-Deniziak, A., Basalaj, K., Strojny, B., Mlocicki, D.,** 2017. New Data on Human Macrophages Polarization by *Hymenolepis diminuta* Tapeworm—An In Vitro Study. *Front. Immunol.* 8, 148.
- **Zhou, L.J., Schwarting, R., Smith, H.M., Tedder, T.F.,** 1992. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J. Immunol.* 149, 735-42.

ANEXO I

Proteínas identificadas en el líquido peritoneal de ovejas no infectadas (NI PF) e infectadas (I PF) con *F. hepatica* del experimento 1 y del experimento llevado a cabo de Belfast, Reino Unido (Apartado 4.2. de Resultados)

Nº	Número de acceso	Anotación	T-Test (valor p): *(p < 0.05)	Fold Change por categoría	valor emPAI						Péptido único						Probabilidad de identificación de la proteína					
					NI PF	NI PF2	IP F	IP F2	NI PF	NI PF2	IP F	IP F2	NI PF	NI PF2	IP F	IP F2	NI PF	NI PF2	IP F	IP F2		
1	W5NX51_SHEEP	Apolipoprotein A-I preproprotein	0,44	1,2	344,54216,36359,19	328,1			36	31	31	33	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
2	Q7M371_SHEEP	Plasma proteinase inhibitor	0,84	0,8	114,64344,37	313 66,634			3	3	3	3	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
3	Q1KY28_OVIMU	Beta globin chain	0,9	0,9	9,319313,3962,0801	18,3			9	11	6	9	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
4	I1WXR3_SHEEP	Alpha-1-antitrypsin transcript variant 1	0,87	1,1	12,61710,457	7,359 17,636			18	16	16	13	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
5	ACTB_SHEEP	Actin	0,79	1,2	5,92210,4344,3895	15,588			16	19	18	20	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
6	W5NWM2_SHEEP	Apolipoprotein A-IV	0,44	0,7	10,77316,8894,9407	13,078			23	23	20	19	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
7	C6ZP47_OVIMU	Alpha globin	0,58	1,8	3,75884,07532,2932	12,72			5	6	4	6	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
8	W5PSQ7_SHEEP	Immunoglobulin lambda light chain	0,5	0,8	12,9510,0286,6861	11,63			9	8	9	9	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
9	W5NR11_SHEEP	Complement C3	*0,0029	1,6	6,63846,676410,851	10,423			28	24	31	27	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
10	W5QHZ5_SHEEP	Ig kappa chain	0,92	1,1	22,263,994618,239	10,204			8	6	8	6	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
11	THY_SHEEP	Transferrin	0,68	1,3	5,98484,15953,7807	9,0602			6	7	5	7	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
12	ANT3_SHEEP	Antithrombin-III	0,99	1	8,84533,59714,5448	7,8352			21	19	18	18	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
13	W5P6Q5_SHEEP	Profilin 1	0,58	1,6	2,46213,37372,0174	7,3486			4	4	4	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
14	W5QSH8_SHEEP	Fibrinogen alpha chain	0,64	1,4	2,68864,26782,5888	6,8859			23	23	26	27	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
15	W5NSA6_SHEEP	Alpha-2-macroglobulin	0,99	1	6,69394,0887	4,242 6,5783			58	43	55	46	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
16	W5QSA6_SHEEP	Fibrinogen gamma B chain	0,81	1,2	2,59514,0932,1264	5,6226			12	14	13	10	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
17	W5P7S6_SHEEP	Alpha-1-acid glycoprotein	0,96	1	2,27245,3584	1,862 5,5025			6	7	6	7	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
18	W5NR63_SHEEP	Protein S100	0,94	1,1	2,29852,07210,2178	4,5134			5	5	1	5	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	100%		
19	W5PHP7_SHEEP	Serpin A3-7	1	1	2,49563,27571,3435	4,4344			13	13	10	13	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
20	W5PZ11_SHEEP	Clusterin	0,81	1,1	3,251,9984	2,21 3,5337			16	14	16	12	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
21	W5PTH1_SHEEP	Vitamin D binding protein	0,33	0,7	4,59223,2222,4595	3,3034			19	14	16	13	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
	AOA0M4KD19_SHEEP																					
22	EP	Adiponectin	0,91	1,1	1,66962,18440,8882	3,2786			4	5	3	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
23	W5P4S0_SHEEP	Ceruloplasmin	0,84	0,9	2,63741,46540,8303	2,7546			32	24	20	23	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
24	W5P8F9_SHEEP	Short palate, lung and nasal epithelium carcinoma associated protein	0,19	1,3	2,42791,82692,7858	2,672			5	6	5	3	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
25	W5P2V0_SHEEP	Ezrin	1	1	0,53222,38510,2497	2,6697			8	21	5	16	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
26	W5NXW9_SHEEP	Ig mu chain IgM	0,29	1,4	1,31591,87051,8856	2,584			9	10	10	8	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
27	W5PE01_SHEEP	Transgelin	0,96	1	1,4989	1,67 0,7534	2,3362		7	8	5	6	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
28	F2YQ13_SHEEP	Gelsolin isoform b	0,39	0,7	4,05872,16021,7283	2,3296			25	19	17	12	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
29	W5QH56_SHEEP	Alpha-2-HS-glycoprotein	0,14	0,6	3,33442,71241,5857	2,2621			12	9	9	7	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
30	K4P1S5_SHEEP	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0,84	0,9	1,13451,92360,3753	2,2277			4	6	2	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
31	W5P5W9_SHEEP	Triosephosphate isomerase	0,92	0,9	1,87341,00940,4642	2,1987			5	4	3	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		

Nº	Número de acceso	Anotación	T-Test (valor p): * (p < 0.05)	Fold Change por categoría	valor emPAI						Péptido único						Probabilidad de identificación de la proteína					
					NI/FP	NI/FP2	IPF	IPF2	NI/FP	NI/FP2	IPF	IPF2	NI/FP	NI/FP2	IPF	IPF2	NI/FP	NI/FP2	IPF	IPF2		
32	W5Q3E0_SHEEP	Thy-1 membrane glycoprotein	0.62	2	0,7515	0,407	0,1672	2,1902	2	2	1	2	2	2	1	2	100%	100%	99%	100%		
33	A4ZYV6_SHEEP	Beta-2-microglobulin	0.73	0.9	1,6696	2,1844	1,3681	2,1286	4	4	4	3	4	4	4	3	100%	100%	100%	100%		
34	W5PIG7_SHEEP	Alpha enolase	0.71	1.5	0,7806	0,7037	0,1966	2,0809	8	7	3	9	8	7	3	9	100%	100%	100%	100%		
35	W5NXL7_SHEEP	Immunoglobulin lambda 2b light chain	0.9	1	2,523	1,3072	1,5874	2,0516	2	3	3	3	2	3	3	3	100%	100%	100%	100%		
36	W5NRG7_SHEEP	Inter-alpha trypsin inhibitor heavy chain H4	0.99	1	1,8258	1,164	1,058	1,95	26	19	20	18	26	19	20	18	100%	100%	100%	100%		
37	W5P1X9_SHEEP	Fructose-bisphosphate aldolase	0.43	0.6	1,8873	1,4791	0,4507	1,6692	10	9	5	7	10	9	5	7	100%	100%	100%	100%		
38	W5QAB1_SHEEP	Hemopexin	0.6	1.3	1,092	0,7458	0,7826	1,6245	9	8	9	8	9	8	9	8	100%	100%	100%	100%		
39	LOCSP6_SHEEP	Peroxiredoxin-5	0.56	0.6	1,1851	1,499	0,05	1,5601	3	4	0	3	3	4	0	3	100%	100%	0%	100%		
40	W5QH54_SHEEP	Fetuin B	0.99	1	1,2659	1,1412	0,8902	1,5111	8	7	6	7	8	7	6	7	100%	100%	100%	100%		
41	143G6_SHEEP	14-3-3 protein gamma	0.49	0.9	1,571	1,4162	1,2872	1,4873	2	2	2	1	2	2	2	1	100%	100%	100%	98%		
42	W5PPQ8_SHEEP	Immunoglobulin J chain	0.78	1.3	0,4515	1,0055	0,37	1,4758	2	2	2	2	2	2	2	2	100%	100%	100%	100%		
43	W5PPT6_SHEEP	Tubulin, beta 5	0.51	0.6	1,1654	1,5143	0,0589	1,475	11	13	1	8	10	13	1	8	100%	100%	99%	100%		
44	THIO_SHEEP	Thioredoxin	0.39	0.5	1,3121	1,8643	0,2617	1,4628	2	3	1	2	2	3	1	2	100%	100%	83%	100%		
45	W5PZI1_SHEEP	Plasma protease C1 inhibitor	0.92	1.1	1,3541	0,6582	0,688	1,4336	10	8	7	8	10	8	7	8	100%	100%	100%	100%		
46	W5P303_SHEEP	14-3-3 protein beta/alpha	0.75	1.1	1,1247	1,0139	0,9216	1,395	5	5	5	4	5	5	5	4	100%	100%	100%	100%		
47	BEUV62_SHEEP	Serpin F1	0.15	0.6	2,3794	1,7106	0,9278	1,3671	14	10	9	7	14	10	9	7	100%	100%	100%	100%		
48	W5PRP1_SHEEP	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	0.89	1.2	0,2979	0,914	0,0742	1,3517	3	7	1	5	3	7	1	5	100%	100%	100%	100%		
49	W5NV46_SHEEP	Serum paraoxonase/arylesterase	0.54	0.8	2,406	1,9089	2,2301	1,3421	11	9	10	5	11	9	10	5	100%	100%	100%	100%		
50	W5NUX8_SHEEP	Complement C4	0.7	0.8	1,9644	0,8522	0,9511	1,3353	42	28	31	23	42	28	31	23	100%	100%	100%	100%		
51	W5NOP5_SHEEP	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	0.45	0.6	2,2412	1,0662	0,7492	1,3344	6	4	5	3	6	4	5	3	100%	100%	100%	100%		
52	W5P824_SHEEP	Actin related protein 2/3 complex subunit 4?	0.42	1.8	0,678	0,3703	0,5555	1,3313	3	2	3	3	3	2	3	3	100%	100%	100%	100%		
53	W5P4R1_SHEEP	Moesin	0.66	1.6	0,2515	0,6473	0,2061	1,2601	2	5	2	6	2	5	2	6	100%	100%	100%	100%		
54	W5P3B5_SHEEP	14-3-3 protein zeta/delta	0.53	0.8	1,1039	1,8628	1,1346	1,255	5	9	7	4	5	9	7	4	100%	100%	100%	100%		
55	W5P1I8_SHEEP	Amine oxidase	0.71	1.1	1,1859	0,7	0,8988	1,2479	13	11	11	10	13	11	11	10	100%	100%	100%	100%		
56	W5NVA7_SHEEP	Phosphatidylethanolamine binding protein 1	0.45	0.5	2,1347	0,8239	0,1432	1,228	4	3	1	3	4	3	1	3	100%	100%	72%	100%		
57	D7RV6_SHEEP	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.42	0.5	0,9648	1,7167	0,173	1,2132	7	9	2	4	7	9	2	4	100%	100%	100%	100%		
58	1433C_SHEEP	14-3-3 protein epsilon	0.67	1.2	0,6003	0,9279	0,657	1,1788	2	4	3	3	2	4	3	3	100%	100%	100%	100%		
59	W5QH28_SHEEP	Ig kappa chain	0.52	1.5	0,594	0,5355	0,4867	1,1663	2	2	2	2	2	2	2	2	100%	100%	100%	100%		
60	Q29439_SHEEP	Complement component C4	*0.018	0.6	2,2126	1,9947	1,2602	1,1557	3	3	3	1	3	3	3	1	100%	100%	100%	100%		
61	W5NP15_SHEEP	Immunoglobulin V lambda chain	0.86	1.1	0,5436	0,8311	0,4455	1,0675	2	2	2	2	2	2	2	2	100%	100%	100%	100%		
62	K4P494_SHEEP	Cystatin C	0.13	1.8	0,5173	0,4663	0,715	1,0158	2	2	2	2	2	2	2	2	100%	100%	100%	100%		
63	ANGT_SHEEP	Angiotensinogen	0.43	0.5	2,6659	0,8763	0,7965	0,9829	12	10	10	6	12	10	10	6	100%	100%	100%	100%		

Nº	Número de acceso	Anotación	T-Test (valor p): * (p < 0.05)	Fold Change por categoría	valor empAI				Péptido único				Probabilidad de identificación			
					NI PF	NI PF2	IPF	IPF2	NI PF	NI PF2	IPF	IPF2	NI PF	NI PF2	IPF	IPF2
64	WSPW21_SHEEP	Inter-alpha trypsin inhibitor heavy chain H2	0,73	0,9	1,21850,62910,61890,9546				17	11	12	10	100%	100%	100%	100%
65	W5NTW3_SHEEP	Inter-alpha trypsin inhibitor heavy chain H1	0,23	0,7	1,21650,96190,60350,9032				16	14	12	9	100%	100%	100%	100%
66	W5NS06_SHEEP	Annexin	0,7	1,4	0,31680,40040,16470,8721				3	4	2	4	100%	100%	100%	100%
67	W5P610_SHEEP	Chloride intracellular channel protein	0,59	1,6	0,27540,39790,22560,8667				2	3	2	3	100%	100%	100%	100%
68	W5PH8_SHEEP	Leucine rich alpha 2 glycoprotein	0,83	1,1	0,55390,49930,34580,8288				5	5	4	4	100%	100%	100%	100%
69	W5PWA8_SHEEP	Heat shock protein beta 1	0,85	0,8	0,41340,6155	0,050,8118			2	3	0	2	100%	100%	0%	100%
70	DOVW20_SHEEP	Tubulin, alpha chain	0,56	0,7	0,74260,66940,12110,8117				8	7	2	5	100%	100%	100%	100%
71	W5P101_SHEEP	Alpha 1B glycoprotein	0,32	1,5	0,49280,35690,48890,7774				5	5	5	5	100%	100%	100%	100%
72	W5QIK8_SHEEP	Selenium binding protein 1	0,23	0,5	0,94140,96990,24730,7678				8	10	4	5	100%	100%	100%	100%
73	W5NY95_SHEEP	Complement factor B	0,67	0,8	1,37880,48540,65010,7646				26	14	20	13	100%	100%	100%	100%
74	W5ODG7_SHEEP	Fibronectin	0,13	2,7	0,24480,19210,45240,7477				16	14	27	21	100%	100%	100%	100%
75	W5PXC8_SHEEP	Alpha 2 antipapain	0,95	1	0,66430,59890,54430,7336				7	6	7	5	100%	100%	100%	100%
76	W5PDE5_SHEEP	C4b binding protein alpha chain	0,39	2,2	0,8376	0,051,22910,6945			4	0	5	2	100%	0%	100%	100%
77	W5NZ11_SHEEP	Sulfotransferase	0,81	0,8	0,49390,4453	0,0860,6885			4	4	1	3	100%	100%	100%	100%
78	W5NRR7_SHEEP	Thyroxine-binding globulin	0,25	0,5	1,0430,6932	0,2690,6447			10	8	4	3	100%	100%	100%	100%
79	W5PUH4_SHEEP	GST pi	0,93	0,9	0,5320,29580,12460,6442				3	2	1	2	100%	100%	98%	100%
80	W5PZM9_SHEEP	Annexin	0,91	0,9	0,8898	0,0850,25530,6119			7	1	3	3	100%	100%	100%	100%
81	W5PD71_SHEEP	C-reactive protein	0,97	1	0,96830,6466	1,030,6066			5	4	5	2	100%	100%	100%	100%
82	W5P510_SHEEP	Complement factor I	0,68	1,1	0,43630,39330,35750,5784				6	7	6	5	100%	100%	100%	100%
83	W5NUE3_SHEEP	Peroxiredoxin 1	0,97	1	0,28660,79750,53970,5627				2	4	4	2	100%	100%	100%	100%
84	W5P6F4_SHEEP	Complement C5	0,42	0,8	0,6840,48090,36860,5349				26	20	20	12	100%	100%	100%	100%
85	W5Q961_SHEEP	Apolipoprotein F	0,76	1,1	0,43540,39250,35670,5338				3	3	3	2	100%	100%	100%	100%
86	W5PDQ9_SHEEP	Complement C1g subcomponent subunit C	0,52	1,5	0,2707	0,2440,22180,5315			2	2	2	2	100%	100%	100%	100%
87	W5QH50_SHEEP	Histidine rich glycoprotein	0,6	0,7	1,0409	0,3840,49690,5229			10	6	7	4	100%	100%	100%	100%
88	W5PTU7_SHEEP	Carbonic anhydrase 2	0,28	0,5	0,7940,53620,10080,5139				5	4	1	2	100%	100%	98%	100%
89	W5PK26_SHEEP	LIM and SH3 domain protein 1 N(G),N(G)-dimethylarginine	0,59	0,6	0,25960,7088	0,050,5097			2	4	0	2	100%	100%	0%	100%
90	W5P671_SHEEP	dimethylaminohydrolase 2	0,9	1,1	0,2585	0,233	0,050,5076		2	2	0	2	100%	100%	0%	100%
91	W5NHY2_SHEEP	Nucleoside diphosphate kinase	0,96	1	0,25330,36430,09770,4975				2	2	1	2	100%	100%	81%	100%
92	EF1D_SHEEP	Elongation factor 1-delta	0,94	0,9	0,39730,22480,09630,4896				3	2	1	2	100%	100%	100%	100%
93	W5P8E9_SHEEP	CD109 antigen	0,87	0,9	0,44710,32030,24370,4755				14	13	12	10	100%	100%	100%	100%
94	W5NYA1_SHEEP	Complement C2	0,79	1,2	0,68260,12440,50040,4728				7	2	8	4	100%	100%	100%	100%
95	W5NSH2_SHEEP	Inter alpha trypsin inhibitor heavy chain H3	0,3	0,7	0,69670,4737	0,3870,4598			13	10	9	6	100%	100%	100%	100%
96	W5PD15_SHEEP	Elongation factor 1-alpha	0,89	0,9	0,23010,46460,18850,4518				3	5	3	3	100%	100%	100%	100%
97	W5NUTO_SHEEP	polymerase 1 and transcript release factor	0,94	0,9	0,3640,2069	0,0890,4506			3	2	1	2	100%	100%	97%	100%
98	W5QH46_SHEEP	Kinogen 2	1	1	0,35410,31920,23520,4389				6	5	4	4	100%	100%	100%	100%
99	W5PXI3_SHEEP	Aflatin	0,22	0,9	0,49230,44380,40340,4335				8	7	7	4	100%	100%	100%	100%
100	W5Q012_SHEEP	Plasma serine protease inhibitor	0,34	0,7	0,48910,44090,17980,4309				6	6	3	2	100%	100%	100%	100%
101	C8BKD1_SHEEP	Prothrombin	0,061	0,8	0,5650,50930,40030,4305				9	8	7	4	100%	100%	100%	100%

Nº	Número de acceso	Anotación	T-Test (valor p): * (p < 0.05)	Fold Change por categoría	valor empAI				Péptido único				Probabilidad de identificación de la proteína			
					NI PF	NI PF2	IPF	IPF2	NI PF	NI PF2	IPF	IPF2	NI PF	NI PF2	IPF	IPF2
102	W5PTE9_SHEEP	Collagen alpha 1(VI)	0,18	2,5	0,1757	0,0918	0,2427	0,4213	4	3	3	7	5	100%	100%	100%
103	W5QF00_SHEEP	Malate dehydrogenase	0,8	1,1	0,2076	0,2954	0,1701	0,4077	2	2	2	2	2	100%	100%	100%
104	ANXA2_SHEEP	Annexin A2	0,094	0,4	0,8728	0,641	0,1596	0,3825	7	5	2	2	2	100%	100%	100%
105	W5Q2E1_SHEEP	Lumican	0,19	0,4	0,5597	0,5045	0,0757	0,3802	5	4	1	2	2	100%	100%	100%
106	W5QJ21_SHEEP	Monocyte differentiation antigen CD14 precursor	0,19	1,7	0,1913	0,1724	0,2464	0,3756	2	2	3	3	2	100%	100%	100%
107	W5NR14_SHEEP	Anirine oxidase	0,95	1	0,3371	0,2356	0,2141	0,3731	2	2	1	1	1	100%	100%	85%
108	W5P323_SHEEP	Glucose-6-phosphate isomerase	0,58	1,6	0,1165	0,1622	0,0954	0,3532	2	3	2	2	2	100%	100%	100%
109	D8X187_SHEEP	Serpin peptidase inhibitor clade B ovalbumin member 1	0,73	0,8	0,2779	0,2505	0,0696	0,3482	3	3	1	2	2	100%	100%	100%
110	W5QA64_SHEEP	HP-20 homolog	0,65	1,2	0,3617	0,15	0,2964	0,3268	2	1	2	1	1	100%	100%	100%
111	W5P3R3_SHEEP	Plasminogen	0,76	0,8	0,3581	0,1896	0,1351	0,3238	8	5	4	3	3	100%	100%	100%
112	W5P9N7_SHEEP	Tetranectin	0,34	0,4	1,5224	0,5262	0,4783	0,3234	4	3	3	3	1	100%	100%	98%
113	W5NQW4_SHEEP	Alpha 1 macroglobulin	0,83	0,8	1,0608	0,1885	0,6976	0,3122	30	9	26	6	100%	100%	100%	100%
114	W5Q4Z3_SHEEP	Insulin like growth factor binding protein complex acid labile subunit	0,88	0,9	0,3434	0,143	0,13	0,3115	4	2	2	2	2	100%	100%	100%
115	W5QAO1_SHEEP	Leucine rich repeat neuronal protein 4	0,72	0,8	0,2723	0,1913	0,05	0,3046	5	4	1	3	3	100%	100%	99%
116	W5PTR5_SHEEP	78 kDa glucose regulated protein	0,49	2,5	0,05	0,0905	0,05	0,3032	0	2	1	1	3	85%	100%	100%
117	W5PFI0_SHEEP	Vinculin	0,3	0,6	0,4	0,2781	0,1497	0,2818	10	8	5	4	100%	100%	100%	100%
118	W5P3I3_SHEEP	Complement C1s subcomponent	0,39	2,1	0,1432	0,05	0,1173	0,2811	2	1	3	3	3	100%	97%	100%
119	W5PGT6_SHEEP	Complement component C6	0,75	0,9	0,4431	0,2364	0,3241	0,279	11	7	9	4	100%	100%	100%	100%
120	W5Q0V2_SHEEP	Biotinidase	0,079	3,5	0,0666	0,06	0,1754	0,2707	1	1	3	2	100%	96%	100%	100%
121	W5PNW7_SHEEP	Vimentin	0,39	0,6	0,2948	0,2657	0,05	0,2701	4	3	0	1	1	100%	100%	98%
122	W5PVL4_SHEEP	Mannose binding protein	0,45	1,5	0,2919	0,2631	0,551	0,2676	2	2	3	1	1	100%	100%	100%
123	W5QA34_SHEEP	Vascular cell adhesion protein-1	0,15	3	0,0885	0,05	0,1517	0,2666	2	0	4	3	100%	0%	100%	100%
124	W5PI98_SHEEP	F actin capping protein	0,24	0,5	0,2892	0,4192	0,1107	0,2653	2	3	1	1	1	100%	100%	99%
125	W5PB46_SHEEP	Phospholipid transfer protein	0,75	1,3	0,2798	0,0571	0,1663	0,2572	4	1	2	2	2	100%	82%	100%
126	W5PUC1_SHEEP	Carbonic anhydrase 3	0,3	0,4	0,4182	0,2359	0,05	0,2415	3	2	0	1	1	100%	100%	61%
127	W5PK03_SHEEP	Perostin	*0,041	5,8	0,05	0,05	0,3415	0,2407	0	0	9	3	88%	0%	100%	100%
128	W5QI29_SHEEP	Extracellular matrix protein 1	0,99	1	0,1214	0,1692	0,05	0,2384	2	3	1	2	100%	100%	100%	100%
129	W5PDJ4_SHEEP	Platelet activating factor acetylhydrolase 1B subunit gamma isoform	0,4	0,6	0,2533	0,2284	0,05	0,2342	2	2	0	1	1	100%	100%	0%
130	W5PH81_SHEEP	Complement component C7	*0,011	0,6	0,3483	0,3605	0,2055	0,232	8	8	6	3	100%	100%	100%	100%
131	W5P880_SHEEP	Proteoglycan 4	0,3	1,9	0,1463	0,05	0,1459	0,2265	5	1	6	4	100%	100%	100%	100%
132	W5NR02_SHEEP	Estrogen response element binding protein	0,4	0,7	0,2427	0,2188	0,0938	0,2248	2	2	1	1	1	100%	100%	98%
133	W5P707_SHEEP	Alpha actinin 4	0,28	0,3	0,8642	0,3276	0,1877	0,2129	17	9	6	3	100%	100%	100%	100%
134	W5PBY0_SHEEP	C4b binding protein alpha chain	0,41	1,4	0,1061	0,1473	0,1339	0,2083	2	3	3	2	100%	100%	100%	100%
135	W5Q9A2_SHEEP	Zinc alpha glycoprotein	0,4	0,7	0,3382	0,1929	0,1753	0,1995	3	2	2	1	1	100%	100%	98%
136	W5PI61_SHEEP	Apolipoprotein E	0,58	0,6	1,1507	0,2975	0,6337	0,1951	8	3	6	1	100%	100%	100%	96%
137	W5PGE5_SHEEP	Ig alpha heavy chain IgA	0,77	0,9	0,3147	0,1801	0,2579	0,1868	3	2	3	1	100%	100%	100%	100%

Nº	Número de acceso	Anotación	T-Test (valor p): * (p < 0.05)	Fold Change por categoría	valor emPAI				Péptido único				Probabilidad de identificación de la proteína			
					NI PF2	IPF	IPF2	NI PF2	NI PF2	IPF	IPF2	NI PF2	NI PF2	IPF	IPF2	
138	W5Q268_SHEEP	Beta 2 glycoprotein 1	0,4	0,7	0,3106	0,1778	0,1616	0,1846	3	2	1	1	100%	100%	100%	98%
139	W5PX38_SHEEP	Mesothelin like	0,46	0,9	0,1773	0,1599	0,1453	0,1667	2	2	1	1	100%	100%	100%	100%
140	W5PF9_SHEEP	Complement factor H	0,4	1,3	0,1638	0,0958	0,1838	0,1545	2	2	2	2	100%	100%	100%	100%
141	W5Q0R1_SHEEP	Sex hormone binding globulin	0,54	0,8	0,1619	0,3164	0,2071	0,1527	2	4	3	1	100%	100%	100%	98%
142	W5PFV5_SHEEP	Puromycin sensitive aminopeptidase	0,49	0,6	0,2515	0,1068	0,0634	0,152	6	3	2	2	100%	100%	100%	100%
143	W5PN88_SHEEP	Elongation factor 2	0,91	1,1	0,1156	0,0681	0,0501	0,1484	3	2	1	2	100%	100%	96%	100%
144	W5Q517_SHEEP	Procollagen C endopeptidase enhancer 1	*0,026	0,6	0,2394	0,2158	0,1259	0,1452	3	3	2	1	100%	100%	100%	90%
145	W5PE22_SHEEP	Rab GDP dissociation inhibitor beta	0,073	0,3	0,3161	0,4609	0,058	0,139	4	6	1	1	100%	100%	100%	100%
146	W5PPG3_SHEEP	4 trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	0,42	0,7	0,1441	0,1299	0,0501	0,1366	2	2	0	1	100%	100%	0%	94%
147	W5Q4Q3_SHEEP	Heparin cofactor 2 precursor	0,24	0,6	0,2887	0,1887	0,1715	0,1281	4	3	3	1	100%	100%	100%	100%
148	W5Q169_SHEEP	Retinal dehydrogenase 2 isoform 1	0,088	0,4	0,2013	0,25	0,0501	0,1235	3	4	0	1	100%	100%	65%	93%
149	W5QC41_SHEEP	Pyruvate kinase	0,37	0,5	0,1189	0,2933	0,0974	0,1133	2	5	2	1	100%	100%	100%	98%
150	W5PID9_SHEEP	Complement component C9	*0,036	0,5	0,251	0,2915	0,1497	0,1127	4	5	3	1	100%	100%	100%	100%
151	D6P2V4_SHEEP	Factor H	0,62	0,8	0,2151	0,1638	0,2045	0,1121	7	5	8	2	100%	100%	100%	100%
152	W5PUE4_SHEEP	Fibrocystin L	0,12	1,6	0,0776	0,05	0,0972	0,1054	10	7	15	7	100%	100%	100%	100%
153	W5QFPO_SHEEP	Thrombospondin 1	0,33	0,6	0,1599	0,0936	0,0501	0,0993	5	4	2	2	100%	100%	100%	100%
154	W5PEI4_SHEEP	Plasma kallikrein	0,26	0,6	0,1021	0,1417	0,0501	0,0977	2	3	1	1	100%	100%	100%	95%
155	W5Q3F9_SHEEP	Aldehyde oxidase	0,34	0,5	0,1801	0,0893	0,0501	0,0949	6	4	0	2	100%	100%	30%	100%
156	W5Q749_SHEEP	Vitamin K dependent protein S	0,84	0,9	0,203	0,0871	0,1664	0,0926	4	2	4	1	100%	100%	100%	100%
157	W5PQK6_SHEEP	Talin 1	0,49	0,8	0,0669	0,0984	0,0548	0,0777	5	8	5	3	100%	100%	100%	100%
158	W5PSA0_SHEEP	Filamin A	0,61	0,8	0,0914	0,0581	0,0501	0,0749	7	5	1	3	100%	100%	100%	100%
159	W5PT68_SHEEP	Filamin B isoform X1	0,92	1	0,0638	0,0575	0,0501	0,0742	5	5	3	3	100%	100%	100%	100%
160	W5PYX8_SHEEP	Complement C3	0,41	0,6	0,1388	0,0694	0,0797	0,05	7	4	4	1	100%	100%	100%	100%
161	W5Q5Q6_SHEEP	Collagen alpha 1 (XIV)	0,098	0,3	0,2138	0,1308	0,05	0,05	10	7	0	1	100%	100%	0%	100%
162	W5Q4S0_SHEEP	Collagen alpha 1 (III)	0,42	0,6	0,1059	0,05	0,05	0,05	3	2	0	1	100%	100%	13%	77%
163	AL1A1_SHEEP	Retinal dehydrogenase 1	0,2	0,2	0,2874	0,1211	0,05	0,05	4	2	0	0	100%	100%	0%	55%
164	W5NX96_SHEEP	Attractin	0,53	0,7	0,1015	0,05	0,0616	0,05	4	2	3	0	100%	100%	100%	46%
165	W5PUT6_SHEEP	Clathrin heavy chain 1	0,42	1	0,05	0,0505	0,05	0,05	2	3	0	0	100%	100%	0%	44%
166	W5P5Q2_SHEEP	Major vault protein	0,056	0,3	0,192	0,1359	0,05	0,05	5	4	0	0	100%	100%	0%	0%
167	W5PGC5_SHEEP	Aldose 1-epimerase	*0,018	0,3	0,2004	0,1806	0,0782	0,05	2	2	1	0	100%	100%	94%	0%
168	W5PJ75_SHEEP	Spectrin alpha chain	1	1	0,05	0,05	0,05	0,05	3	3	0	0	100%	100%	0%	0%
169	W5NXJ3_SHEEP	Complement C4	0,12	0,3	0,4335	0,2791	0,1611	0,05	2	2	0	0	100%	100%	63%	0%
170	W5PEL2_SHEEP	Mimcan isoform 1	0,2	0,4	0,2222	0,3172	0,1821	0,05	2	3	2	0	100%	100%	100%	0%
171	W5PD62_SHEEP	Carboxypeptidase B2	*0,05	0,3	0,1525	0,2142	0,05	0,05	2	3	0	0	100%	100%	34%	0%
172	W5P812_SHEEP	Protein AMBP	0,28	0,6	0,1919	0,173	0,1572	0,05	2	2	2	0	100%	100%	100%	0%
173	W5P813_SHEEP	Ribonuclease UK114	0,26	0,3	1,0171	0,5355	0,4867	0,05	3	2	2	0	100%	100%	100%	0%
174	W5Q9B2_SHEEP	Rho GDP dissociation inhibitor 1	0,091	0,1	0,541	0,3004	0,05	0,05	3	2	0	0	100%	100%	0%	0%
175	W5P9U4_SHEEP	Proteasome subunit alpha type	*0,043	0,2	0,2606	0,3754	0,05	0,05	2	3	0	0	100%	100%	0%	0%
176	W5P5W6_SHEEP	Protein NDRG1	*0,0057	0,3	0,167	0,1506	0,05	0,05	2	2	0	0	100%	100%	0%	0%

ANEXO II

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Immune signatures of pathogenesis in the peritoneal compartment during early infection of sheep with *Fasciola hepatica*

Maria Teresa Ruiz-Campillo¹, Veronica Molina Hernandez², Alejandro Escamilla¹, Michael Stevenson², Jose Perez¹, Alvaro Martinez-Moreno¹, Sheila Donnelly³, John P. Dalton² & Krystyna Cwiklinski²

Immune signatures of sheep acutely-infected with *Fasciola hepatica*, an important pathogen of livestock and humans were analysed within the peritoneal compartment to investigate early infection. Within the peritoneum, *F. hepatica* antibodies coincided with an intense innate and adaptive cellular immune response, with infiltrating leukocytes and a marked eosinophilia (49%). However, while cytokine qPCR analysis revealed IL-10, IL-12, IL-13, IL-23 and TGF β were elevated, these were not statistically different at 18 days post-infection compared to uninfected animals indicating that the immune response is muted and not yet skewed to a Th2 type response that is associated with chronic disease. Proteomic analysis of the peritoneal fluid identified infection-related proteins, including several structural proteins derived from the liver extracellular matrix, connective tissue and epithelium, and proteins related to the immune system. Periostin and vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1), molecules that mediate leukocyte infiltration and are associated with inflammatory disorders involving marked eosinophilia (e.g. asthma), were particularly elevated in the peritoneum. Immunohistochemical studies indicated that the source of periostin and VCAM-1 was the inflamed sheep liver tissue. This study has revealed previously unknown aspects of the immunology and pathogenesis associated with acute fascioliasis in the peritoneum and liver.

Fasciolosis is a disease of ruminants caused by the liver fluke *Fasciola hepatica*, and results in worldwide economic losses of greater than US \$3 billion per annum^{1–3}. It is also recognised by the World Health Organisation (WHO) as an important zoonosis; global infections are estimated between 2 and 17 million, with 180 million people at risk of infection^{4–6}. The economic losses in ruminants are associated with the liver damage caused by parasites migrating through the definitive hosts resulting in poor food conversion, impaired fertility and reduced wool and milk production^{7–11}.

Parasite migration begins following the ingestion of the infective encysted stage, the metacercariae, that excyst within the intestine as newly excysted juveniles (NEJs). The NEJs traverse the intestinal wall into the peritoneal cavity, where they continue to migrate through the liver capsule into the liver parenchyma. Those parasites that reach the liver, normally between four and six days post-infection, cause extensive tissue damage and haemorrhaging in the liver parenchyma resulting in the hepatic pathogenesis associated with acute fasciolosis¹². *F. hepatica* secretes molecules that modulate the host immune response and induce the development of a Th2 response and concomitant inhibition of protective pro-inflammatory responses as the disease progresses to chronicity^{12,13}. This polarisation of the immune responses is sufficiently potent to influence the host's susceptibility to co-infections with bacterial pathogens^{13–19}.

Acute fasciolosis is especially problematic in sheep that die suddenly from haemorrhage and liver damage, particularly when large numbers of migrating immature flukes enter the liver; according to the National Animal Disease Information Services (NADIS) it is estimated that up to 10% of sheep at risk of infection in the UK will

¹School of Veterinary Medicine, University of Cordoba, Cordoba, Spain. ²School of Biological Sciences, Medical Biology Centre, Queen's University of Belfast, Belfast, Northern Ireland, UK. ³The i3 Institute & School of Life Sciences, University of Technology, Sydney, Australia. Correspondence and requests for materials should be addressed to K.C. (email: k.cwiklinski@qub.ac.uk)

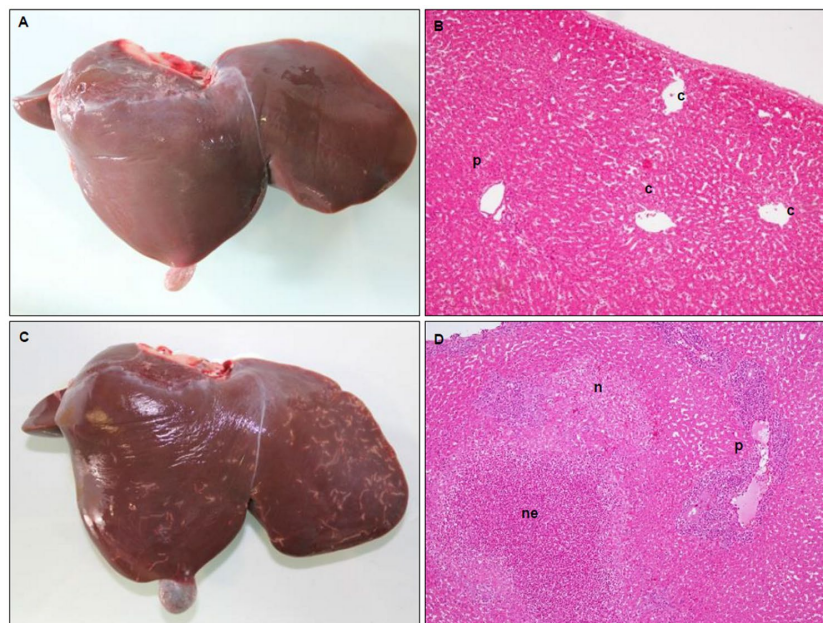


Figure 1. Comparison of gross and microscopical liver pathology between uninfected (A and B) and infected (C and D) animals. (A) Liver showing no apparent gross pathology. (B) HE stained liver microphotograph showing centrilobular veins (c) and portal spaces (p) with blood vessels and bile ducts and absence of inflammatory infiltrate (Magnification x400). (C) Liver showing white tortuous tracts caused by *F. hepatica*. (D) HE stained liver microphotograph displaying acute small necrotic foci without inflammatory infiltrate (n), acute necrotic foci with presence of abundant necrotic inflammatory cells (ne) and severe inflammatory infiltrate in adjacent portal spaces (Magnification x400).

die of acute disease²⁰. Clinical signs of infection include anaemia, dyspnoea, ascites and abdominal pain, which are also associated with sub-acute disease. Parasite populations resistant to the frontline anthelmintic used to treat acute fasciolosis, triclabendazole, are becoming more prevalent leaving farmers with no means of controlling acute infection²¹.

Studies have shown that as the parasite migrates through the intestinal epithelium clinical signs are not evident, although an immunological response is induced, as illustrated by the large number of immune cells infiltrating into the peritoneal cavity^{22,23}. Since the parasite migrates from the intestine to the liver via the peritoneum we considered that investigation of the peritoneal compartment of infected animals may provide new information of the early immune response in this compartment that can be exploited for vaccine development. At the same time, the data could also identify important host-specific proteins related to infection.

Proteomic analysis of the host response to *F. hepatica* has been carried out on host bile and serum^{24,25}, with the analysis of bile representing the chronic stages of infection when the adult parasites have migrated through the liver to the bile ducts²⁴ and the serum representing the systemic response²⁵. However, to date, the use of proteomics tools for the analysis of peritoneal fluid has only been reported in patients with uremia, endometriosis, ovarian cancer and following cases of peritoneal dialysis^{26–29}, which has facilitated the development of biomarkers for these respective diseases/pathologies.

In the present study, we examined the changes that occur within the peritoneal compartment of sheep during the first 18 days of infection (dpi) with *F. hepatica*. This is the first differential proteomic analysis of peritoneal fluid comparing uninfected and infected sheep. Our data reveal immune signatures within the peritoneum, with the identification of molecular markers of significant parasite-induced liver pathogenesis. These molecular markers may be useful for vaccine development studies in the future, particularly in relation to defining correlates of protective immune responses.

Results

Early liver pathology caused by the migration of immature *Fasciola hepatica*. No gross changes on either the diaphragmatic or visceral surface (Fig. 1A) were observed for the uninfected sheep. Liver from infected sheep (18 dpi) showed white/yellow foci and tortuous tracts ranging from 0.2–1.5 cm length located on the liver surface, mainly on the diaphragmatic aspect of the left lobe, consistent with *F. hepatica* infection (Fig. 1C). For some of the sheep, spots or small red tracts due to hyperaemia and haemorrhage could be observed.

At the microscopic level, histopathology revealed no hepatic damage in the uninfected sheep (Fig. 1B). In the infected animals, necrotic foci and necrotic tortuous tracts within the hepatic parenchyma, mainly involving

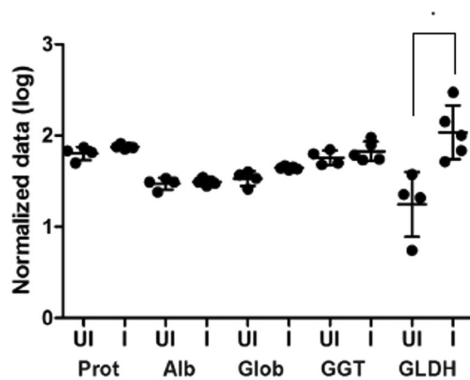


Figure 2. Liver enzyme profile. Serum from uninfected (UI) and infected (I) sheep, representing the mean ($n = 5$) of each group \pm standard deviation were analysed for a variety of liver enzymes. The normalised data is shown by a dot plot on a log scale. Prot: total protein (g/l); Alb: albumin (g/l); Glob: globulin (g/l); GGT: gamma glutamyl-transferase (units/l) and GLDH: glutamate dehydrogenase (units/l). *P value = 0.01.

sub-capsular areas were observed (Fig. 1D). Examination of the acute necrotic foci revealed a moderate inflammatory infiltrate, with a predominant infiltration of eosinophils and minimal infiltration of neutrophils (<1–2%), and peripheral focal haemorrhages. Portal spaces adjacent to necrotic foci showed severe inflammatory infiltrate suggesting that the route of the infiltrating inflammatory cells was through the portal vessels.

Liver enzyme analysis of the infected animals was consistent with the stage of liver fluke infection of the liver migrating parasites; elevated levels of glutamate dehydrogenase (GLDH) indicative of liver disease were observed, which were statistically significant when compared to the uninfected animals, based on normalised data (P value < 0.01). Furthermore, very low levels of gamma glutamyl-transferase (GGT), which is typically used as an indicator of chronic infection, were observed in both infected and non-infected groups (Fig. 2). Although the values observed for GLDH were significantly different between the groups, this was only observed when the data was normalised and large variation was observed between the animals suggesting that these serum enzymes may not be reliable markers for fasciolosis in sheep in the first 18 dpi. Analysis of liver enzymes within the peritoneal fluid found lower levels of GLDH compared to serum and no significant differences between the uninfected and infected animals (data not shown). GLDH originates from hepatocytes located in the centrilobular area of the liver that express high levels of this enzyme and directly release it into the circulation making it more readily detected in serum³⁰.

Immune signatures within the peritoneal compartment during acute *F. hepatica* infection. Using a combination of western blot and ELISA we evaluated the humoral immune response against *F. hepatica* in the peritoneal fluid of uninfected and infected animals (Fig. 3A,B). IgG antibodies against the recombinant *F. hepatica* antigen FhCL1 were markedly increased in the peritoneal fluid of infected sheep confirming *F. hepatica* infection (P value < 0.01). No FhCL1-specific antibodies were detected in uninfected sheep. This is the first report of the *F. hepatica* ELISA utilising FhCL1 being used for peritoneal fluid.

Analysis of the leukocyte profile found within the peritoneum revealed that the humoral response against *F. hepatica* coincides with a cellular immune response as observed by the statistically significant rise in total leukocyte number within the peritoneal fluid, from a mean value of $6 \times 10^6 \pm 2.6$ (SD) cells per ml in the uninfected animals to a mean value of $25 \times 10^6 \pm 15.6$ (SD) cells per ml (P value < 0.05; Fig. 3C). In addition, the populations of individual cell types were dramatically altered; most notably, with 49% of the cell population comprised of eosinophils in the infected sheep compared to 2% in the uninfected sheep, which represented a 94-fold increase in the actual number of eosinophils at 18 dpi compared to uninfected sheep (P value < 0.01). Whilst the proportion of macrophages and lymphocytes in the total cell counts were reduced following infection (Fig. 3D), due to the 4-fold increase in total cell count, the actual cell numbers increased 2-fold and 2.5-fold, respectively (Fig. 3E). There was also no evidence of mast cells or basophils within the cellular infiltrates, consistent with other studies in sheep³¹.

An extensive panel of ovine cytokines related to parasite infection were selected for qPCR analysis of the transcripts isolated from total peritoneal cells. Some primers were obtained from the literature, while others were designed as part of this study using available ovine cytokine gene sequences (Table 1). Cytokines IL-1, IL-4 and IL-5, and the chemokine Eotaxin were not detected in our samples from infected and non-infected animals. Five cytokines (IL-10, IL-12, IL-13, IL-23 and TGF- β) were shown to be more highly transcribed by the peritoneal cells from infected animals compared to cells taken from uninfected animals, relative to three housekeeping genes, β -actin, beta-2-microglobulin (B2M) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Fig. 4). These results were not shown to be statistically significant due to the high variability between the animals.

ECM proteins associated with infection and liver pathology. Comparative analysis of the peritoneal fluid recovered from the uninfected and infected sheep identified a total of 176 proteins based on at least

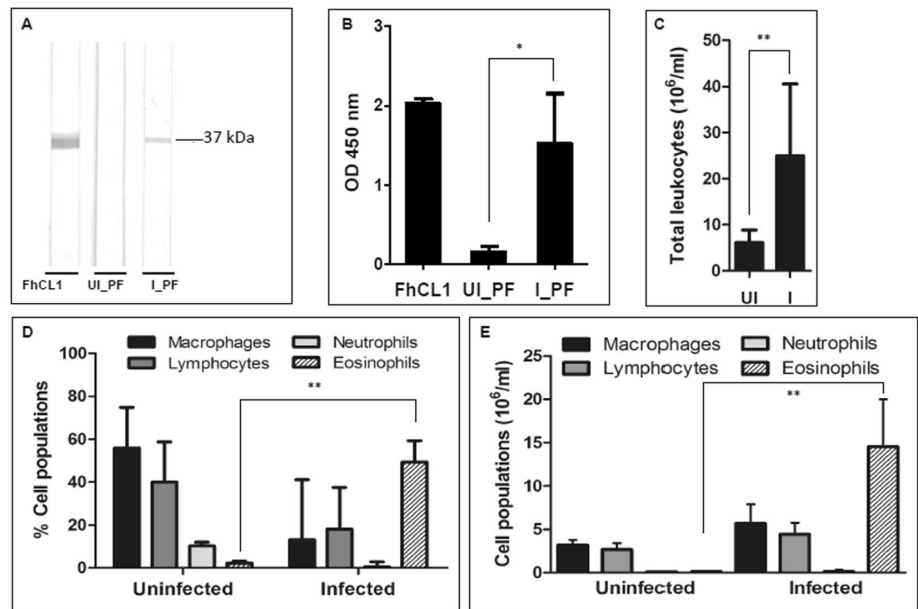


Figure 3. Peritoneal fluid humoral and cellular analysis. (A) Detection of *F. hepatica* cathepsin L1 (FhCL1) specific antibodies in peritoneal fluid by immunoblotting. Lane 1: FhCL1 positive control; Lane 2: peritoneal fluid from the uninfected pool (UI_PF); Lane 3: peritoneal fluid from the infected pool (I_PF). (B) IgG level response in peritoneal fluid against *F. hepatica* cathepsin L1 (FhCL1). 1: FhCL1 positive control; 2: uninfected (UI_PF); 3: infected (I_PF). (C) Total mean cell count per ml in the peritoneal fluid from the uninfected (UI) and infected (I) groups ($n = 5$; \pm standard deviation is represented). (D) Mean differential cell count showing the percentages of macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils in the peritoneal fluid of uninfected and infected sheep ($n = 5$; \pm standard deviation is represented). (E) Mean differential cell count of macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils in the peritoneal fluid of uninfected and infected sheep ($n = 5$; \pm standard deviation) represented by cell number. *P value < 0.05; **P value < 0.01.

Cytokine	Forward sequence 5'-3'	Reverse sequence 5'-3'	Reference
IFN- γ	ATCTCTTTCGAGGCCGAGAGA	ATTGCAGGCAGGAGAACCAT	110
IL-1	CACTGCCAGAAAATAAGCTGAAAC	TGATCAAGCAAATCGCCTGAT	111
IL-4	GGAGCTGCCTGTAGCAGACG	TTCTCAGTTGCGTTCTTTGGG	110
IL-5	CTGCTGATAGGTGATGGAACTT	GGTGATTGTATGCTGAGGAGTAGG	110
IL-10	CTGAGAACCATGGGCCTGAC	TCTCCCCAGCGAGTTAC	110
IL-12	GAATTCTCGGCAGGTGGAAG	GTGCTCCACGTGTCAGGGTA	110
IL-13	AGAACCAGAAGTGCCGCT	GGTTGAGGCTCCACACCATG	110
IL-17	TGTGAGGGTCAACCTGAACAT	TGATAATCGGTGGCCTTCTG	111
IL-23	GGGAAGTGGACAGAGGTTCC	CTGCCTCTCCAATCTGGGTG	112
TNF- α	CCCGTCTGGACTTGGATCCT	TGCTTTTGGTGCTCATGGTG	110
TGF β 1	GAACTGCTGTGTTCTGACG	GGTTGTGCTGGTTGTACAGG	113
Arginase	GCGGAAGTCAAGAAGACTGG	AGGTTGTCCATGCAAGTTCC	Current study \pm
iNOS	TAGAGGAACATCTGGCCAGG	TGGCAGGGTCCCCTCTGATG	Current study $^{\wedge}$
Eotaxin	ACAAGAAAATCTGTGTTGATCCCC	CCATGGCATTCTGGACCC	111
B2M	TTCTGTCCACGCTGAGTTCA	CAACCCAAATGAGGCATCGT	*
B-actin	ACCAGTTCGCCATGGATGA	AGCCGTTGTCAACCACGAG	110
GAPDH	GGTGATGCTGGTGCTGAGTA	TCATAAGTCCCTCCACGATG	111

Table 1. Primers for quantitative PCR (qPCR) cytokine analysis. *Pacheco, I.L., personal communication. \pm Based on *Ovis aries* arginase 1 (XM_004011324). $^{\wedge}$ Based on the bovine sequences from Adler *et al.*¹¹⁴ using the *Ovis aries* nitric oxide synthase 2 gene (XM_004012488).

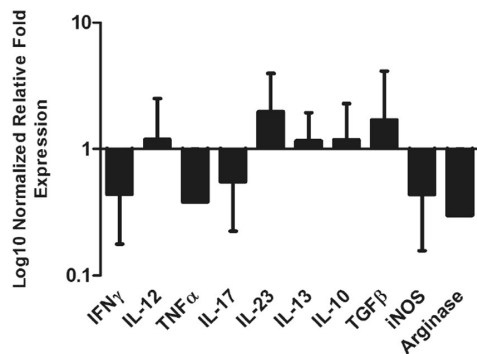


Figure 4. Analysis of relative quantitative cytokine gene expression within the cells of the peritoneal fluid, represented by normalized relative fold expression on log10 scale. Immune marker transcript abundance of the infected group was normalised against the abundance of the respective transcripts in the uninfected group. Transcript abundance of the uninfected group (not shown on graph) is equal to 1. Data represents mean \pm SEM of fold changes in target transcript abundance relative to three house-keeping genes: β -actin, B2M and GAPDH. Each bar represents data from five biological replicates; statistical analyses were performed using One Way ANOVA with Tukey's post hoc tests, comparing the data from the uninfected with infected samples, which showed no statistical differences based on animal variation within each group.

two unique peptides and the presence in both biological samples from experimental sheep trials carried out in Spain and the UK, which were classified according to putative function (Supplementary Table 1; Supplementary Fig. 1). Several structural proteins were identified related to the liver extracellular matrix (ECM), connective tissue and epithelium, including collagen VI structural unit proteins, fibronectin and fibrocystin, as well as proteins related to the immune system including immunoglobulins and components of the complement system (Fig. 5). Of particular note were the ECM-related proteins that showed the highest fold change differences in the infected animals when compared with the uninfected animals, namely, periostin (fold change 5.8) and vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1; fold change 3) (Fig. 5B). Periostin is associated with several inflammatory disorders and in particular, has been shown to be a systemic biomarker of airway eosinophilia in asthmatic patients being related with eosinophilic airway inflammation^{32,33}. VCAM-1, a leukocyte adhesion molecule expressed by cytokine-activated endothelial cells in culture, mediates mononuclear leukocyte infiltration in vessels and interstitium³⁴. To confirm the presence of these proteins within the liver, we used an immunohistochemistry approach on sections of liver from the uninfected and infected sheep (Fig. 6). Periostin was found to be confined to the cytoplasm of hepatocytes and localised in the liver parenchyma in both the uninfected and infected animals (Fig. 6B,E and H, respectively). Interestingly, stronger periostin-related staining was observed in the hepatocytes surrounding the necrotic foci of infected animals. Furthermore, a moderate number of inflammatory cells were positive in the inner area of the acute necrotic foci and within the acute inflammatory infiltrate associated with the portal space (Fig. 6E and H). VCAM-1 was detected in the liver from infected animals, mostly in the inflammatory cells showing a reticular pattern; morphology compatible with dendritic cells within sites of acute inflammation. No VCAM-1 positive cells were found within the acute necrotic foci (Fig. 6F and I), compared with the very few positive cells with macrophage morphology localised in the portal spaces of the uninfected animals (Fig. 6C). Surprisingly, no VCAM-1 positive endothelial cells were detected in either the uninfected or infected animals.

Discussion

The migration of *F. hepatica* NEJ from the intestine to the liver is a critical step in the parasites' establishment of infection in the mammalian host. Entry of the liver is accompanied by the development of the parasite gut, metabolic alterations, rapid growth and a marked regulation of expression of >8000 genes³⁵. From the hosts' point of view, penetration and migration through the liver provokes severe pathogenesis as a result of intense inflammatory immune responses to fluke secretory antigens (including many proteases) and tissue damage. Prevention of tissue damage and inflammation is the primary aim of disease control; this makes the flukicide triclabendazole very attractive as a treatment since it is the only drug effective against the early migratory stages of the parasite. The spread of triclabendazole-resistant parasites, however, has left farmers without a means to control early and acute fasciolosis and consequently the disease has become increasingly prevalent in Europe and elsewhere^{12,21,36}. Our focus is to develop an effective vaccine against *F. hepatica* that is directed at the early migratory stages to prevent their penetration into, and migration within, the liver. For this, we need to further understand the immune response of the host to these early invasive stages, particularly in the vicinity of their migration i.e. the peritoneal cavity.

The immunological profile in the peritoneum during early stages of fasciolosis reflects that specific immune signatures can be identified within the ovine peritoneal compartment. Analysis of the peritoneal fluid showed a clear antibody response characterised by the presence of anti-FhCCL1 (a secreted protease) antibodies. Furthermore, there was intense cellular activity of both innate (macrophages, eosinophils) and adaptive

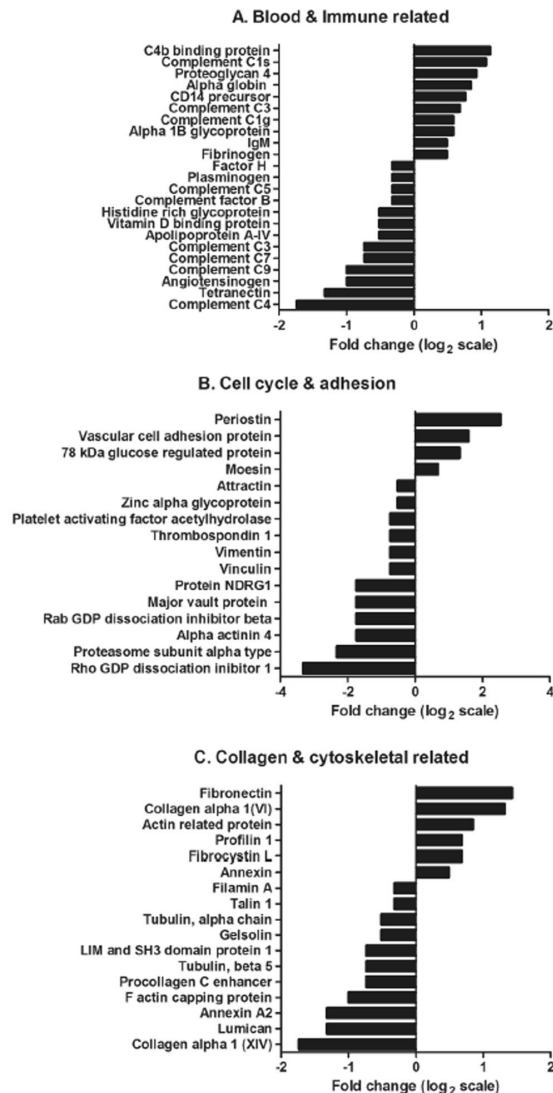


Figure 5. Expression profile of proteins identified within the peritoneal fluid relating to (A) blood, coagulation and the immune system, (B) cell cycle and cell adhesion, (C) collagen and cytoskeletal structure. The fold change, represented on a log₂ scale, was calculated based on the differences in protein concentration (emPAI values) between the uninfected and infected peritoneal fluid samples.

(lymphocytes) immune cells. Most notable was the very marked eosinophilia (49% of immune cells). Eosinophilia is also observed within the peritoneum during the early stages of infection in rats³⁷, and was observed by both histocytochemical studies^{22, 23, 38} and transcriptome analysis of *F. hepatica*-infected sheep liver^{39, 40}. Marked eosinophilia is typical of helminth infections that drive Th2-dominant immune responses and in some cases, for example primary filarial infections⁴¹ and schistosomiasis^{42, 43}, is associated with significant immune protection. However, the role of these cells in regulating immune responses to infection and their direct anti-parasite function is being heavily debated. Studies using eosinophil deficient mice infected with *Schistosoma mansoni* and *Nippostrongylus brasiliensis* have shown that the high levels of eosinophils may play a role in tissue remodelling rather than as agents of parasite damage (reviewed by⁴⁴). Similarly Ohnmacht and colleagues⁴⁵ suggest that the peritoneal cavity is a reservoir for eosinophils during helminth infection. Given the lack of resistance observed in sheep (reviewed by³⁶) and our observations of marked eosinophilia within the peritoneum we would conclude they are not protective in primary responses in this species. Coupled with the lack of eosinophil degranulation proteins observed within the peritoneal fluid and the fact that the majority of the *F. hepatica* parasites at 18 dpi

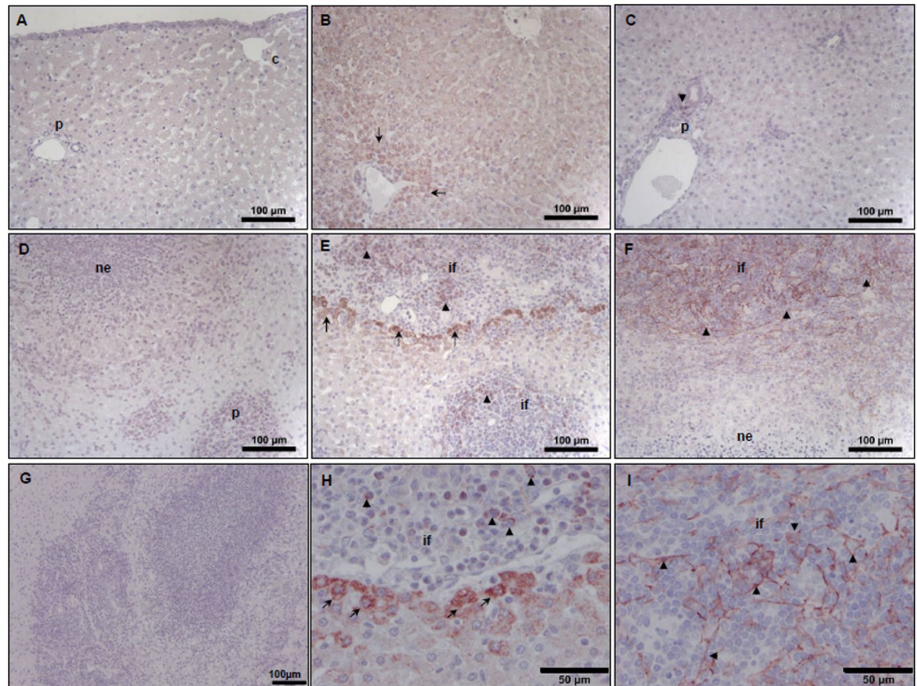


Figure 6. Immuno-labelling potential biomarkers of liver damage. Liver sections from uninfected (A,B,C) and infected sheep (D,E,F,H,I) were probed with periostin rabbit anti-mouse polyclonal antibody (B,E and H) and Vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1) rabbit anti-rat, mouse, human monoclonal antibody (C,F and I). Rabbit pre-immune serum (A and D) and staining using the goat anti-rabbit biotinylated secondary antibody only (G) were used as negative controls. Panels H and I are high powered images of panels E and F representing periostin and VCAM-1 staining, respectively. Periostin reactivity in the uninfected sheep (B) is found in the cytoplasm of hepatocytes, particularly in peribulbar areas (arrows), whereas in the infected sheep (E and H) strong reactivity is found in hepatocytes (arrows) adjacent to inflammatory infiltrates (if) surrounding necrotic foci and in inflammatory cells (arrow heads). VCAM-1 is weakly expressed in the uninfected sheep (C) but strongly expressed in acute infection (F and I) particularly in the inflammatory infiltrates (if) showing a reticular pattern (arrow heads). ne: acute necrotic foci; if: inflammatory infiltrate; p: portal space. Scale bars represent 100 μ m (A–G) and 50 μ m (H and I).

are present within the liver, this implies that the peritoneal cavity acts as a reservoir for non-activated eosinophils that disseminate from here to other compartments.

F. hepatica infection studies in mice^{46,47} and ruminants^{48–51} show that the immune response is dominated by a Th2-type response. However, most studies in ruminants have examined infections at patent or chronic stages when significant parasite development and host tissue damage has occurred^{48,49,51}. Our present study is the first to investigate early immune responses in the peritoneum compartment at a very early stage of infection. Our cytokine analysis of the mixed population of peritoneal cells by qPCR detected increased transcription of cytokines IL-12 and IL-23 that are associated with pro-inflammatory processes. Increased gene transcription of TGF- β and IL-10 was also observed in the infected animals, with TGF- β being implied in anti-inflammatory responses inducing fibrosis and tissue regeneration. TGF- β and IL-10 also play a central role in minimizing pathology and enhancing tissue repair during helminth infections^{52,53}. Interestingly, we did not observe IL-4, but perhaps transcription of this cytokine is down-regulated by TGF- β as seen in *N. brasiliensis* infections in mice whereby Treg-derived TGF- β counterbalanced IL-4 expression⁵⁴. Similarly, in *F. hepatica*-infected mice only low levels of IL-4 transcription can be detected at 14 days post infection⁴⁶. Overall, our data imply that, the immune responses initiated within this mixed population of cells, comprised of 20% lymphocytes, prior to 18 days of *F. hepatica* infection in sheep is weak and not differentiated to a Th2 type typical of chronic infection. The potent skewing towards a Th2 response appears only to occur after the parasite has penetrated the liver parenchyma and caused significant tissue damage (12; Cwiklinski *et al.*, unpublished).

To further describe the immuno-pathological responses to *F. hepatica* infection and complement previous studies of the peritoneal compartment^{55–57}, we employed a novel approach to identify the proteins present within sheep peritoneal fluid during early *F. hepatica* infection using proteomics. This was performed by electrophoretically separating the proteins under denaturing conditions and then slicing fractions above and below the predominant host proteins (circa 67 kDa albumin; Supplementary Figure 1). While we likely missed proteins

at similar migration to albumin we were able to identify 176 peritoneal fluid proteins. This data provides the first step to characterising the proteins that may play an important role in immunopathology and/or can act as biomarkers of infection. This study also reflects analysis of the host response following infection with different *F. hepatica* isolates, a UK isolate (South Gloucester) and an Italian isolate. Genetic analysis of these isolates has yet to be carried out, though recent studies have shown that *F. hepatica* is highly polymorphic and isolates within the UK show high levels of genetic diversity^{35, 58}, indicating that these two isolates could exhibit differences. From the host's point of view, comparative analysis of our proteomic data revealed a strong positive correlation between the biological replicates of each time-point (uninfected: $r = 0.8799$, $P < 0.0001$; infected: $r = 0.7693$, $P < 0.0001$), with the same proteins identified at comparable levels, based on emPAI values. As this study focussed on the early stages of infection, the number of parasites responsible for the infection cannot be quantified, so inferences of the virulence/pathogenicity of these isolates were not made as part of this study. However, based on similar pathology and immune responses across both experiments, these results indicate that despite potential genetic diversity, during the early stages of infection, the host response is comparable to each isolate.

The protein periostin is of particular interest because not only was it dramatically increased in the peritoneal fluid of infected animals it was also particularly abundant in the cytoplasm of hepatocytes surrounding the necrotic foci, within inflammatory cells of the acute necrotic foci and within the acute inflammatory infiltrate associated with the portal space. As several cell types express periostin, including epithelial cells, fibroblasts (peritoneal and liver) and hepatocytes^{59–68}, the source of periostin within the peritoneal fluid may be damaged liver tissues. Alternatively, the protein could be secreted by the peritoneal eosinophils that predominate in the cavity. Periostin has been shown to be involved in cellular dedifferentiation, ECM deposition and angiogenesis^{33, 63, 64}, and within the liver where it plays a role in wound repair and tissue remodelling it co-localises with and binds to the ECM proteins fibronectin, tenascin C and fibrillar collagen (I, II, V) to form a connective tissue structure⁶⁵. As well as being involved in fibrosis, periostin could also play a role in promoting eosinophil recruitment and migration within the ECM as observed in asthmatic studies^{32, 66–68}. It has been suggested that soluble periostin may drive adhesion of eosinophils to ECM fibronectin increasing their survival⁶⁸. Interestingly, expression of periostin is strongly associated with Th2-mediated pathologies^{69–71} and has been proposed as a biomarker for Th2-driven/eosinophilic inflammation⁶⁶. For example, elevated levels of periostin can be detected in the serum of patients with acute or chronic hepatitis⁷².

The abundance of the adhesion protein VCAM-1 within the infected peritoneal cavity was supported by immunohistochemistry analysis that showed its enhanced expression in liver tissue of infected sheep compared to non-infected animals. This is consistent with other studies showing an increase in VCAM-1 expression associated with chronic liver and biliary diseases⁷³. As observed in this study, VCAM-1 expression is low in resting, undamaged cells but during liver inflammation its expression increases, and is believed to be important for recruitment of monocytes and lymphocytes^{74–76}. Cannistra *et al.*⁷⁷ showed that functional VCAM-1 is expressed on activated mesothelial cells and may play a role in the distal arm of leukocyte trafficking to the abdominal cavity. Intestinal epithelial cells are also capable of expressing VCAM-1 during mucosal inflammation⁷⁸, which could be released into the peritoneum following migration of the NEJs across the intestine.

We identified several components of the complement system (C1–C9) within our proteomic data. In particular, C1 g and s subcomponents and C3, together with the C4b binding protein were shown to be increased at 18 dpi, with C3 being statistically upregulated (P value = 0.0029). C3 is the parent protein of C3a, which has shown to be an eosinophil chemo-attractant⁷⁹ and therefore the proteolytic cleavage of this protein may be associated with the increase in peritoneal eosinophils we observed. The importance of the complement cascade system during *F. hepatica* infection is further highlighted by liver transcriptome analysis performed by Alvarez-Rojas and colleagues³⁹ that reported the upregulation of genes related to the complement system two weeks post infection, particularly the C4b binding protein. *In vitro* studies have shown that complement activation on the surface of juvenile stages of *S. mansoni* can mediate parasite killing^{80, 81}. While studies have shown that parasites, including *F. hepatica*, are able to inhibit both the classical and alternative complement pathways as part of their survival strategies^{82, 83}, the possible interaction between the complement cascade and *F. hepatica* NEJs warrants further investigation.

Our proteomic analysis also detected components of the liver ECM within the peritoneal fluid that are likely associated with the liver damage caused by the digestive activity of the migrating parasites. Collagen VI was particularly abundant, perhaps not surprisingly as it is found throughout the connective tissue, forming branching networks that bind to other ECM proteins. This networking-forming collagen increases during liver fibrosis, and an increase of its soluble form in the circulation of patients with chronic liver disease is often seen as a marker for tissue damage and hepatic fibrosis^{84–87}. Collagen VI gene expression was also found to be upregulated in 8-week post *F. hepatica* infection sheep livers by Alvarez-Rojas and colleagues³⁹, indicating its role in liver re-modelling following parasite infection.

Another early marker of liver damage is the increased expression and deposition of the adhesion protein fibronectin^{88–90}, which is actively secreted by hepatic stellate cells in response to liver injury⁷². We observed increased levels of fibronectin within the peritoneal fluid, which together with collagen VI, may be released from the liver as the NEJ actively migrates through the connective tissue within the liver, rather than penetrating through the fibrillary collagen structures (collagen I, III & V) at this early stage.

The ability to uncover host-parasite interactions can now be complemented through the availability of extensive bioinformatic datasets for both *F. hepatica*^{35, 91–93} and various definitive hosts of this parasite, including the bovine and ovine genomes^{94–96}. Our particular study was made possible through the availability of the most recent *Ovis aries* genome⁹⁶. In addition, studies analysing host-specific responses using transcriptomics are now being carried out^{40, 41, 97, 98}. A recent study by Alvarez-Rojas and colleagues³⁹ exploring the livers of *F. hepatica* infected sheep highlighted the transcriptomic changes observed within the liver eight weeks post infection, including several upregulated genes linked to fibrosis (tgf- β related genes, calponin, transgelins and osteopontin) and markers

of a T-cell response (BCL6, CD86, IL1R2, IL18BP, IL27RA, TGF β and TNF). Osteopontin together with periostin, has been shown to mediate chronic rhinosinusitis inflammation by inducing a proliferative response of the ECM⁹⁹. As fibrosis typically occurs four weeks post infection, periostin may be facilitating liver re-modelling without inducing fibrosis prior to the induction of other fibrosis-associated proteins, as has been observed in myocardial tissue^{100,101}. We observed no IFN γ expression at 18 dpi, which may be connected to IL18BP expression, a natural inhibitor of IFN γ ¹⁰²; a marker that requires further investigation. Although, the upregulation of TGF β is consistent with our study, the remaining markers found to be upregulated at eight week post-infection are different, reflecting the different tissue/cells used for analysis and that the immune response profile changes during the course of infection.

Our study focussing at early infection in the peritoneum compartment has identified immune signatures associated with early fasciolosis. Given that we have shown here that serum levels of GLDH and GGT are not reliable markers of liver damage prior to 18 dpi, and that immune responses have not yet differentiated, this study has identified new molecules associated with early *F. hepatica* infection at this stage. These biological markers may be useful in future diagnostics and also in vaccine development studies to define correlates of protective immune responses.

Methods

Ethical statement. All animal work carried out in Spain was approved by the Bioethical Committee of the University of Cordoba (1118) and was carried out according to the Directive 2010/63/EU and Spanish (Ley 6/2013) directives for animal experimentation. Experimental procedures at the Agri-Food and Biosciences Institute (AFBI; UK) were carried out under license from the Department of Health, Social Services and Public by the Animal (Scientific Procedures) Act 1986 (License No. PPL 2771), after ethical review by the AFBI Animal Ethics Committee.

Sheep infections. Trial one: Ten 8-month-old male Merino-breed sheep (Spain) were allocated in two groups; uninfected ($n = 5$) and infected ($n = 5$). The infected group was orally infected with 150 *F. hepatica* metacercariae (South Gloucester isolate; Ridgeway Research Ltd) administered in gelatine capsules with a dosing gun. Animals were killed at 18 days post-infection (dpi) by intravenous injection of thiobarbital. At necropsy, the visceral and diaphragmatic aspects of the liver were photographed for gross evaluation. Tissue samples from the left and right hepatic lobes were fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin wax. For histopathology, 4 μ m paraffin wax liver sections were stained with haematoxylin and eosin (HE).

Trial two: Ten 6 month-old male Dorset cross sheep (UK) were allocated in two groups; uninfected group ($n = 5$) and infected group ($n = 5$). The infected group was orally infected with 150 *F. hepatica* metacercariae (Italian isolate; Ridgeway Research Ltd) administered in water. Animals were euthanised at 18 dpi by captive bolt. At necropsy, the visceral and diaphragmatic aspects of the liver were photographed for gross evaluation.

Recovery of peritoneal fluid. Peritoneal washing was conducted as previously described by Zafra *et al.*^{22,23}. The recovered peritoneal fluid was centrifuged at $430 \times g$ for 5 min and the supernatant and cell pellet retained. The cell pellet was re-suspended in 1 ml DPBS and erythrocyte contamination removed using an erythrolysis buffer (155 mM Ammonium chloride, 10 mM Potassium bicarbonate, 0.1 mM EDTA). Cell viability and total cell count was assayed by trypan blue staining. Cell smears stained using panoptic stain for the differential cell counts were also performed using Vectabond-treated slides to determine the percentage of macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils within the cell pellet. This was calculated as a percentage of 100 cells, using differential nucleus and cytoplasm colour granule morphology to determine cell type.

The peritoneal fluid supernatant was centrifuged as follows, discarding any recovered pellet at each step: (1) $1720 \times g$ for 10 min; (2) $25,000 \times g$ for 30 min. Samples of the peritoneal fluid supernatants was concentrated (15-fold) by centrifugation in an Amicon Ultra-15 centrifugal filter unit ($4000 \times g$ at 4°C), followed by a final centrifugation at $21,000 \times g$ for 20 min at 4°C . Equal protein concentrations (20 μ g) from the concentrated peritoneal fluid supernatants were taken from the five animals of both the uninfected and infected groups, which were pooled for proteomic analysis.

Detection of anti-*Fasciola hepatica* cathepsin L1 (rFhCL1) antibodies in the peritoneal fluid by ELISA. Flat-bottom 96 well microtitre plates (Nunc MaxiSorp) were coated with 0.5 μ g/ml of FhCL1 antigen and incubated overnight at 4°C . After 3 washes with PBS 0.05% Tween 20 (PBST; pH 7.4), 200 μ l/well of blocking buffer (5% skimmed-milk powder diluted in PBST) was added and incubated for 1 h at room temperature (RT). After washing 3 times, 100 μ l of the rabbit anti-FhCL1¹⁰³ and concentrated peritoneal fluid samples diluted 1:6400 in PBST were added to the microtitre plates in triplicate and incubated for 1 h at 37°C . After washing 4 times, the plate was incubated with 100 μ l/well of 1:10,000 polyclonal donkey anti-sheep IgG conjugated to horseradish peroxidase (Novex) for 1 h at 37°C . After washing 5 times, 100 μ l TMB substrate (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Liquid Substrate Supersensitive) was added to each well. Following 15 min incubation the reaction was stopped with the addition of 100 μ l 2 M sulphuric acid. A peritoneal fluid sample was considered to be positive when the OD-value, determined at a wavelength of 450 nm, was greater than the OD mean of peritoneal fluid samples from the uninfected group plus 2 standard deviations.

Detection of *Fasciola hepatica* cathepsin L1 (rFhCL1) specific antibodies in peritoneal fluid by immunoblotting. SDS-PAGE was performed using 4–12% NuPAGE Bis-Tris gels and 5 μ g of recombinant FhCL1 in 50 μ l of NuPAGE LDS sample buffer, followed by protein transfer to a nitrocellulose membrane (0.2 μ m pore size). The nitrocellulose membrane was incubated in blocking buffer (5% skimmed-milk powder in TBST; 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 1% Tween20, pH 7.0) for 1 h at RT. The membranes were probed overnight at RT with a pool of concentrated peritoneal fluid from the uninfected and infected groups diluted 1:1000 in

TBST or as a positive control an anti-FhCL1 antibody¹⁰³ diluted 1:1000 in TBST. Following 3×10 min washes in TBST, the membranes were probed with an alkaline phosphatase conjugated polyclonal donkey anti-sheep IgG antibody (Sigma) diluted 1:5000 for 1 h at RT, followed by 3×10 min washes in TBST. Immuno-reactive bands were visualised using NBT/BCIP (Sigma).

Serum levels of liver enzymes. Analysis of liver enzymes within the plasma of all animals was carried out for the following parameters: total protein, albumin, globulin, gamma glutamyl-transferase (GGT) and glutamate dehydrogenase (GLDH).

Quantification of the cytokine expression in peritoneal cells by quantitative PCR (qPCR). Messenger RNA (mRNA) was extracted from the peritoneal cells (3×10^6 cells) using QIAzol (Qiagen) followed by DNase treatment. First strand cDNA was synthesised using SuperscriptTM II RNase H-Reverse Transcriptase and random primers (Life Technologies). qPCR reactions were performed in 20 μ l reaction volume in triplicate, using 2 μ l cDNA diluted 1:20, 10 μ l of Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG kit (Life Technologies) and 1 μ M of each primer (Table 1). qPCR was performed using the following cycling conditions: 95 °C: 10 min; 39 cycles: 95 °C: 10 s, 55 °C: 15 s, 72 °C: 20 s; 72 °C: 5 min. Relative expression analysis was performed manually using Pfaffl's Augmented $\Delta\Delta$ Ct method¹⁰⁴ whereby the comparative cycle threshold (Ct) values of the samples of interest are compared to a control and normalised to three housekeeping genes, β -actin, B2M and GAPDH, according to a modified tool from geNorm. In order for this method to be valid, amplification efficiencies of individual reactions were verified using the comparative quantification package within the Rotor-Gene Q software v2.1.0. Annealing temperatures and melt-curve analysis was also carried out to check for single DNA products produced by these primer sets.

Mass spectrometry analysis of ovine peritoneal fluid. Pooled peritoneal fluid supernatant samples from the uninfected and infected groups from the two experimental trials were precipitated using trichloroacetic acid (TCA), followed by analysis by 1-DE using a 4–12% SDS PAGE (Criterion XT Bis-Tris; BioRad). In-gel trypsin digestion was carried out followed by ES/MS-MS analysis using an Eksport NanoLC425 (Eksigent) coupled to a 5600+ mass spectrometer (AB Sciex) equipped with a nanoelectrospray ion source. Peak list files were generated by Paragon and Progroup algorithms (Protein Pilot version 5.0; Sciex) using default parameters.

Database searching and criteria for protein identification. All MS/MS spectra were analysed with Mascot (version 2.4.0), against the Uniprot sheep protein databank (27174 entries), assuming digestion with trypsin with 2 missed cleavages permitted. Fragment and parent ion mass tolerance for Mascot were set at 0.10 Da. Carbamidomethylation of cysteine was specified as a fixed modification and oxidation of methionine was specified as a variable modifications. Scaffold (version 4.6.2; Proteome Software Inc) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95% probability to achieve an FDR less than 1% by the Scaffold Local FDR algorithm¹⁰⁵. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 95% probability to achieve an FDR less than 1% and contained at least 2 identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm¹⁰⁶. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

Protein abundance was calculated by Scaffold software based upon the normalised exponentially modified protein abundance index (emPAI) protocol. A normalization minimum value of 0.05 was added to all values to compensate for null or zero values and to allow for log transformation of the data. The averages of the emPAI values from the biological replicates were used for statistical analysis of protein abundance, resulting in an overall fold change difference being calculated relative to the uninfected group. Multiple pairwise t-tests were performed in Scaffold; P value < 0.05 was deemed statistically significant.

Liver Immunohistochemistry (IHC). Three μ m paraffin wax liver sections were analysed using the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method. Tissue sections were dewaxed, rehydrated and endogenous peroxidase activity was exhausted by incubation with 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min at RT. Two different antigen retrieval pre-treatments were used^{107, 108}: (1) Detection of periostin: 0.01 M sodium citrate buffer, pH 6, heated for 20 min; (2) Detection of VCAM-1: Tris-EDTA buffer, pH 9, heated for 30 min. Sections were washed in PBS (pH 7.2) and incubated with 20% normal goat serum (ImmunoPure) for 30 min at RT. Endogenous liver biotin was blocked using the Avidin/Biotin blocking kit (Vector Laboratories). Overnight incubations at 4 °C were carried out using the following primary antibodies, rabbit anti-human periostin polyclonal antibody (LifeSpan BioSciences) and VCAM-1 rabbit anti-mouse monoclonal antibody (also cross reacts with rat & human; Abcam) both diluted 1:500 in PBS containing 10% normal goat serum. Following washing in PBS, the sections were incubated with the secondary antibody (goat anti-rabbit biotinylated antibody; Dako) diluted 1:200 in PBS containing 10% normal goat serum for 30 min at RT. After washing in PBS, the sections were incubated with the ABC complex (Vectastain ABC Elite Kit) for 1 h at RT in darkness, washed in 0.05 M Tris buffered saline (pH 7.6) and then incubated in the chromogen solution (Vector NovaRED Peroxidase Substrate Kit). Finally, the sections were counterstained with Harris' hematoxylin and mounted in Eukitt quick-hardening mounting medium (Sigma).

Statistical Analysis. Mann Whitney U tests and One Way ANOVA with Tukey's post hoc tests performed on GraphPad Prism version 6.00 were used for statistical comparisons. P values of <0.05 was considered to be statistically significant. Correlation analysis of the proteomic data was performed on GraphPad Prism version 6.00.

Accession Codes. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE¹⁰⁹ partner repository with the dataset identifier PXD005548 and 10.6019/PXD005548.

References

- Spithill, T. W. *et al.* Development of vaccines against *Fasciola hepatica* in Fasciolosis (ed Dalton, J. P.) 377–410 (CABI Publishing, 1999).
- Mas-Coma, S., Bargues, M. D. & Valero, M. A. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* **35**, 1255–1278, doi:10.1016/j.ijpara.2005.07.010 (2005).
- Piedrafito, D., Spithill, T. W., Smith, R. E. & Raadsma, H. W. Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. *Parasite Immunol.* **32**, 572–581, doi:10.1111/j.1365-3024.2010.01223.x (2010).
- Mas-Coma, S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J. Helminthol.* **79**, 207–216, doi:10.1079/JOH2005296 (2005).
- Mas-Coma, S., Valero, M. A. & Bargues, M. D. Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv. Parasitol.* **69**, 41–146, doi:10.1016/S0065-308X(09)69002-3 (2009).
- Gonzalez, L. C. *et al.* Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: an altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Trop.* **120**, 119–129, doi:10.1016/j.actatropica.2011.07.002 (2011).
- Sangster, N. C. Managing parasiticide resistance. *Vet. Parasitol.* **98**, 89–109, doi:10.1016/S0304-4017(01)00425-3 (2001).
- Mezo, M., Gonzalez-Warleta, M., Castro-Hermida, J. A. & Ubeira, F. M. Evaluation of the flukicide treatment policy for dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Vet. Parasitol.* **157**, 235–243, doi:10.1016/j.vetpar.2008.07.032 (2008).
- Knubben-Schweizer, G. *et al.* Control of bovine fasciolosis in dairy cattle in Switzerland with emphasis on pasture management. *Vet. J.* **186**, 188–191, doi:10.1016/j.tvjl.2009.08.003 (2010).
- Animal Health Ireland. Liver Fluke - the facts. <http://www.animalhealthireland.ie/ckfinder/userfiles/files/Animal%20Health%20Liver%20Fluke%206pp-web%281%29.pdf> (2011).
- Charlier, J., Vercruyse, J., Morgan, E., van Dijk, J. & Williams, D. J. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitology* **141**, 326–335, doi:10.1017/S0031182013001662 (2014).
- Molina-Hernandez, V. *et al.* *Fasciola hepatica* vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Vet. Parasitol.* **208**, 101–111, doi:10.1016/j.vetpar.2015.01.004 (2015).
- Dalton, J. P., Robinson, M. W., Mulcahy, G., O'Neill, S. M. & Donnelly, S. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet. Parasitol.* **195**, 272–285, doi:10.1016/j.vetpar.2013.04.008 (2013).
- Aitken, M. M., Hughes, D. L., Jones, P. W., Hall, G. A. & Smith, G. S. Immunological responses of fluke-infected and fluke-free cattle to *Salmonella dublin* and other antigens. *Res. Vet. Sci.* **27**, 306–312 (1979).
- Aitken, M. M., Jones, P. W., Hall, G. A., Hughes, D. L. & Brown, G. T. Responses of fluke-infected and fluke-free cattle to experimental reinfection with *Salmonella dublin*. *Res. Vet. Sci.* **31**, 120–126 (1981).
- Hall, G. A. *et al.* Experimental oral *Salmonella dublin* infection in cattle: effects of concurrent infection with *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* **91**, 227–233, doi:10.1016/0021-9975(81)90027-X (1981).
- Brady, M. T., O'Neill, S. M., Dalton, J. P. & Mills, K. H. *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **67**, 5372–5378 (1999).
- Flynn, R. J., Mannion, C., Golden, O., Hacariz, O. & Mulcahy, G. Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* **75**, 1373–1381, doi:10.1128/IAI.01445-06 (2007).
- Flynn, R. J. *et al.* Co-Infection of cattle with *Fasciola hepatica* and *Mycobacterium bovis*: immunological consequences. *Transbound Emerg. Dis.* **56**, 269–274, doi:10.1111/jva.2009.56.issue-6-7 (2009).
- NADIS. Liver fluke control in sheep. Accessed <http://www.nadis.org.uk/bulletins/liver-fluke-control-in-sheep.aspx> (February 2017).
- Brennan, G. P. *et al.* Understanding triclabendazole resistance. *Exp. Mol. Pathol.* **82**, 104–109, doi:10.1016/j.yexmp.2007.01.009 (2007).
- Zafra, R. *et al.* Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* **148**, 373–384, doi:10.1016/j.jcpa.2012.08.007 (2013).
- Zafra, R. *et al.* Early hepatic and peritoneal changes and immune response in goats vaccinated with a recombinant glutathione transferase sigma class and challenged with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* **94**, 602–609, doi:10.1016/j.rvsc.2012.10.026 (2013).
- Morphew, R. M., Wright, H. A., LaCourse, E. J., Woods, D. J. & Brophy, P. M. Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during *in vitro* culture ex host. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 963–972, doi:10.1074/mcp.M600375-MCP200 (2007).
- Rioux, M. C. *et al.* Discovery and validation of serum biomarkers expressed over the first twelve weeks of *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Int. J. Parasitol.* **38**, 123–136, doi:10.1016/j.ijpara.2007.07.017 (2008).
- Ferrero, S. *et al.* Proteomic analysis of peritoneal fluid in women with endometriosis. *J. Proteome Res.* **6**, 3402–3411, doi:10.1021/pr060680q (2007).
- Ferrero, S. *et al.* Proteomic analysis of peritoneal fluid in fertile and infertile women with endometriosis. *J. Reprod. Med.* **54**, 32–40 (2009).
- Amon, L. M. *et al.* Integrative proteomic analysis of serum and peritoneal fluids helps identify proteins that are up-regulated in serum of women with ovarian cancer. *PLoS One* **5**, e11137, doi:10.1371/journal.pone.0011137 (2010).
- Wang, H. Y. *et al.* Impact of uremic environment on peritoneum: a proteomic view. *J. Proteomics* **75**, 2053–2063, doi:10.1016/j.jprot.2012.01.011 (2012).
- eCLINPATH; online textbook on Veterinary Clinical Pathology by Cornell University College of Veterinary Medicine. Accessed March 2017 <http://www.eclinpath.com/chemistry/liver/liver-injury/glutamate-dehydrogenase/>.
- Al-Rukibat, R. K., Ismail, Z. B., Al-Majali, A. M. & Al-Zghoul, M. B. Peritoneal fluid analysis in adult, nonpregnant Awassi sheep. *Vet. Clin. Pathol.* **35**, 215–218, doi:10.1111/vcp.2006.35.issue-2 (2006).
- Jia, G. *et al.* Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **130**, 647–654.e10, doi:10.1016/j.jaci.2012.06.025 (2012).
- Liu, A. Y., Zheng, H. & Ouyang, G. Periostin, a multifunctional extracellular matrix protein in inflammatory and tumor microenvironments. *Matrix Biol.* **37**, 150–156, doi:10.1016/j.matbio.2014.04.007 (2014).
- Bacchi, C. E. *et al.* Expression of vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) in liver and pancreas allograft rejection. *Am. J. Pathol.* **142**, 579–591 (1993).
- Cwiklinski, K. *et al.* The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biol.* **16**, 71–015-0632-2 (2015).
- Toet, H., Piedrafito, D. M. & Spithill, T. W. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int. J. Parasitol.* (2014).
- Sibille, P., Tliba, O. & Boulard, C. Early and transient cytotoxic response of peritoneal cells from *Fasciola hepatica*-infected rats. *Vet. Res.* **35**, 573–584, doi:10.1051/vetres:2004033 (2004).

38. Perez, J. *et al.* Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *J. Comp. Pathol.* **127**, 30–36, doi:[10.1053/jcpa.2002.0561](#) (2002).
39. Alvarez Rojas, C. A. *et al.* Transcriptional analysis identifies key genes involved in metabolism, fibrosis/tissue repair and the immune response against *Fasciola hepatica* in sheep liver. *Parasit. Vectors* **8**, 124–015–0715–7 (2015).
40. Rojas-Caraballo, J. *et al.* Gene Expression Profile in the Liver of BALB/c Mice Infected with *Fasciola hepatica*. *PLoS One* **10**, e0134910, doi:[10.1371/journal.pone.0134910](#) (2015).
41. Cadman, E. T. *et al.* Eosinophils are important for protection, immunoregulation and pathology during infection with nematode microfilariae. *PLoS Pathog.* **10**, e1003988, doi:[10.1371/journal.ppat.1003988](#) (2014).
42. Davies, S. J. *et al.* *In vivo* imaging of tissue eosinophilia and eosinopoietic responses to schistosome worms and eggs. *Int. J. Parasitol.* **35**, 851–859, doi:[10.1016/j.ijpara.2005.02.017](#) (2005).
43. Reimert, C. M. *et al.* Eosinophil activity in *Schistosoma mansoni* infections *in vivo* and *in vitro* in relation to plasma cytokine profile pre- and post-treatment with praziquantel. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 584–593, doi:[10.1128/CVI.13.5.584-593.2006](#) (2006).
44. Hogan, S. P. *et al.* Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 709–750, doi:[10.1111/j.1365-2222.2008.02958.x](#) (2008).
45. Ohnmacht, C., Pullner, A., van Rooijen, N. & Voehringer, D. Analysis of eosinophil turnover *in vivo* reveals their active recruitment to and prolonged survival in the peritoneal cavity. *J. Immunol.* **179**, 4766–4774, doi:[10.4049/jimmunol.179.7.4766](#) (2007).
46. Donnelly, S., O'Neill, S. M., Sekiya, M., Mulcahy, G. & Dalton, J. P. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect. Immun.* **73**, 166–173, doi:[10.1128/IAI.73.1.166-173.2005](#) (2005).
47. Donnelly, S. *et al.* Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *FASEB J.* **22**, 4022–4032, doi:[10.1096/fj.08-106278](#) (2008).
48. Mulcahy, G. *et al.* Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* **16**, 932–939, doi:[10.1016/S0264-410X\(97\)00289-2](#) (1998).
49. Mulcahy, G. *et al.* Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Res. Vet. Sci.* **67**, 27–33, doi:[10.1053/rvsc.1998.0270](#) (1999).
50. Walsh, K. P., Brady, M. T., Finlay, C. M., Boon, L. & Mills, K. H. Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses. *J. Immunol.* **183**, 1577–1586, doi:[10.4049/jimmunol.0803803](#) (2009).
51. Flynn, R. J., Mulcahy, G. & Elsheikha, H. M. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: implications for control. *Vet. Parasitol.* **169**, 235–240, doi:[10.1016/j.vetpar.2010.02.015](#) (2010).
52. Hacariz, O., Sayers, G., Flynn, R. J., Lejeune, A. & Mulcahy, G. IL-10 and TGF-beta1 are associated with variations in fluke burdens following experimental fasciolosis in sheep. *Parasite Immunol.* **31**, 613–622, doi:[10.1111/pim.2009.31.issue-10](#) (2009).
53. Belkaid, Y., Blank, R. B. & Saffia, I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol. Rev.* **212**, 287–300, doi:[10.1111/j.0105-2896.2006.00409.x](#) (2006).
54. Macey, M. R. *et al.* IL-4 and TGF-beta 1 counterbalance one another while regulating mast cell homeostasis. *J. Immunol.* **184**, 4688–4695, doi:[10.4049/jimmunol.0903477](#) (2010).
55. Smith, N. C., Ovington, K. S. & Boray, J. C. *Fasciola hepatica*: free radical generation by peritoneal leukocytes in challenged rodents. *Int. J. Parasitol.* **22**, 281–286, doi:[10.1016/S0020-7519\(05\)80005-0](#) (1992).
56. Piedrafito, D. *et al.* Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity *in vitro* against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infect. Immun.* **75**, 1954–1963, doi:[10.1128/IAI.01034-06](#) (2007).
57. Jedlina, L., Kozak-Ljunggren, M. & Wedrychowicz, H. *In vivo* studies of the early, peritoneal, cellular and free radical response in rats infected with *Fasciola hepatica* by flow cytometric analysis. *Exp. Parasitol.* **128**, 291–297, doi:[10.1016/j.exppara.2011.02.004](#) (2011).
58. Beesley, N. J., Williams, D. J., Paterson, S. & Hodgkinson, J. *Fasciola hepatica* demonstrates high levels of genetic diversity, a lack of population structure and high gene flow: possible implications for drug resistance. *Int. J. Parasitol.* **47**, 11–20, doi:[10.1016/j.ijpara.2016.09.007](#) (2017).
59. Sidhu, S. S. *et al.* Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 14170–14175, doi:[10.1073/pnas.1009426107](#) (2010).
60. Tartibi, H. M. & Bahna, S. L. Clinical and biological markers of asthma control. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 1453–1461, doi:[10.1586/1744666X.2014.962516](#) (2014).
61. Rosselli-Murai, L. K. *et al.* Periostin responds to mechanical stress and tension by activating the MTOR signaling pathway. *PLoS One* **8**, e83580, doi:[10.1371/journal.pone.0083580](#) (2013).
62. Riener, M. O. *et al.* Expression of the extracellular matrix protein periostin in liver tumours and bile duct carcinomas. *Histopathology* **56**, 600–606, doi:[10.1111/j.1365-2559.2010.03527.x](#) (2010).
63. Braun, N. *et al.* Periostin: a matricellular protein involved in peritoneal injury during peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.* **33**, 515–528, doi:[10.3747/pdi.2010.00259](#) (2013).
64. Conway, S. J. *et al.* The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol. Life Sci.* **71**, 1279–1288, doi:[10.1007/s00018-013-1494-y](#) (2014).
65. Takayama, G. *et al.* Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**, 98–104, doi:[10.1016/j.jaci.2006.02.046](#) (2006).
66. Li, W. *et al.* Periostin: its role in asthma and its potential as a diagnostic or therapeutic target. *Respir. Res.* **16**, 57–015–0218–2 (2015).
67. Parulekar, A. D., Atik, M. A. & Hanania, N. A. Periostin, a novel biomarker of TH2-driven asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **20**, 60–65, doi:[10.1097/MCP.0000000000000005](#) (2014).
68. Johansson, M. W., Annis, D. S. & Mosher, D. F. Alpha(M)beta(2) integrin-mediated adhesion and motility of IL-5-stimulated eosinophils on periostin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **48**, 503–510, doi:[10.1165/rcmb.2012-0150OC](#) (2013).
69. Bobolea, I. *et al.* Sputum periostin in patients with different severe asthma phenotypes. *Allergy* **70**, 540–546, doi:[10.1111/all.12580](#) (2015).
70. Masuoka, M. *et al.* Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *J. Clin. Invest.* **122**, 2590–2600, doi:[10.1172/JCI58978](#) (2012).
71. Sehra, S. *et al.* Periostin regulates goblet cell metaplasia in a model of allergic airway inflammation. *J. Immunol.* **186**, 4959–4966, doi:[10.4049/jimmunol.1002359](#) (2011).
72. Huang, Y. *et al.* Matricellular protein periostin contributes to hepatic inflammation and fibrosis. *Am. J. Pathol.* **185**, 786–797, doi:[10.1016/j.ajpath.2014.11.002](#) (2015).
73. Afford, S. C. *et al.* Vascular cell adhesion molecule 1 expression by biliary epithelium promotes persistence of inflammation by inhibiting effector T-cell apoptosis. *Hepatology* **59**, 1932–1943, doi:[10.1002/hep.26965](#) (2014).
74. Paik, Y. H. *et al.* Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* **37**, 1043–1055, doi:[10.1053/jhep.2003.50182](#) (2003).
75. Jaruga, B., Hong, F., Kim, W. H. & Gao, B. IFN-gamma/STAT1 acts as a proinflammatory signal in T cell-mediated hepatitis via induction of multiple chemokines and adhesion molecules: a critical role of IRF-1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **287**, G1044–52, doi:[10.1152/ajpgi.00184.2004](#) (2004).
76. Qin, P., Tang, X., Elloso, M. M. & Harnish, D. C. Bile acids induce adhesion molecule expression in endothelial cells through activation of reactive oxygen species, NF-kappaB, and p38. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H741–7, doi:[10.1152/ajpheart.01182.2005](#) (2006).

77. Cannistra, S. A., Ottensmeier, C., Tidy, J. & DeFranzo, B. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by peritoneal mesothelium partly mediates the binding of activated human T lymphocytes. *Exp. Hematol.* **22**, 996–1002 (1994).
78. Li, X. C., Jevnikar, A. M. & Grant, D. R. Expression of functional ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules by an immortalized epithelial cell clone derived from the small intestine. *Cell. Immunol.* **175**, 58–66, doi:10.1006/cimm.1996.1050 (1997).
79. DiScipio, R. G. & Schraufstatter, I. U. The role of the complement anaphylatoxins in the recruitment of eosinophils. *Int. Immunopharmacol.* **7**, 1909–1923, doi:10.1016/j.intimp.2007.07.006 (2007).
80. Ramalho-Pinto, F. J., McLaren, D. J. & Smithers, S. R. Complement-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils *in vitro*. *J. Exp. Med.* **147**, 147–156, doi:10.1084/jem.147.1.147 (1978).
81. Vignali, D. A., Bickle, Q. D., Taylor, M. G., Tennent, G. & Pepys, M. B. Comparison of the role of complement in immunity to *Schistosoma mansoni* in rats and mice. *Immunology* **63**, 55–61 (1988).
82. Montgomery, T. D., Leid, R. W. & Wescott, R. B. Interaction of bovine complement with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* **19**, 55–65, doi:10.1016/0304-4017(86)90032-4 (1986).
83. Baeza, E., Poitou, I., Villejoubert, C. & Boulard, C. Complement depletion in rats infected with *Fasciola hepatica*: *in vivo* and *in vitro* studies. *Vet. Parasitol.* **51**, 219–230, doi:10.1016/0304-4017(94)90159-7 (1994).
84. Schuppan, D., Ruehl, M., Somasundaram, R. & Hahn, E. G. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.* **21**, 351–372, doi:10.1055/s-2001-17556 (2001).
85. Ruhl, M. *et al.* Soluble collagen VI drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of Bax. *J. Biol. Chem.* **274**, 34361–34368, doi:10.1074/jbc.274.48.34361 (1999).
86. Atkinson, J. C., Ruhl, M., Becker, J., Ackermann, R. & Schuppan, D. Collagen VI regulates normal and transformed mesenchymal cell proliferation *in vitro*. *Exp. Cell Res.* **228**, 283–291, doi:10.1006/excr.1996.0328 (1996).
87. Mak, K. M., Sehgal, P. & Harris, C. K. Type VI Collagen: Its Biology and Value as a Biomarker of Hepatic Fibrosis. *Austin Biomark Diagn.* **1**, 9, doi:10.1155/2014/839560 (2014).
88. Hahn, E., Wick, G., Pencev, D. & Timpl, R. Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. *Gut* **21**, 63–71, doi:10.1136/gut.21.1.63 (1980).
89. Odenthal, M., Neubauer, K., Meyer zum Buschenfelde, K. H. & Ramadori, G. Localization and mRNA steady-state level of cellular fibronectin in rat liver undergoing a CCl₄-induced acute damage or fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1181**, 266–272, doi:10.1016/0925-4439(93)90031-U (1993).
90. Rescan, P. Y. *et al.* Distribution and origin of the basement membrane component perlecan in rat liver and primary hepatocyte culture. *Am. J. Pathol.* **142**, 199–208 (1993).
91. Robinson, M. W., Menon, R., Donnelly, S. M., Dalton, J. P. & Ranganathan, S. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 1891–1907, doi:10.1074/mcp.M900045-MCP200 (2009).
92. Young, N. D., Hall, R. S., Jex, A. R., Cantacessi, C. & Gasser, R. B. Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica* - a key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite. *Biotechnol. Adv.* **28**, 222–231, doi:10.1016/j.biotechadv.2009.12.003 (2010).
93. Cancela, M. *et al.* Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics* **11**, 227–2164–11–227 (2010).
94. Reese, J. T. *et al.* Bovine Genome Database: supporting community annotation and analysis of the *Bos taurus* genome. *BMC Genomics* **11**, 645–2164–11–645 (2010).
95. Childers, C. P. *et al.* Bovine Genome Database: integrated tools for genome annotation and discovery. *Nucleic Acids Res.* **39**, D830–4, doi:10.1093/nar/gkq1235 (2011).
96. Jiang, Y. *et al.* The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. *Science* **344**, 1168–1173, doi:10.1126/science.1252806 (2014).
97. Fu, Y. *et al.* Transcriptomic Study on Ovine Immune Responses to *Fasciola hepatica* Infection. *PLoS Negl Trop. Dis.* **10**, e0005015, doi:10.1371/journal.pntd.0005015 (2016).
98. Alvarez Rojas, C. A. *et al.* Time-Course Study of the Transcriptome of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from Sheep Infected with *Fasciola hepatica*. *PLoS One* **11**, e0159194, doi:10.1371/journal.pone.0159194 (2016).
99. Daines, S. M., Wang, Y. & Orlandi, R. R. Periostin and osteopontin are overexpressed in chronically inflamed sinuses. *Int. Forum. Allergy Rhinol.* **1**, 101–105, doi:10.1002/alr.v1.2 (2011).
100. Kuhn, B. *et al.* Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat. Med.* **13**, 962–969, doi:10.1038/nm1619 (2007).
101. Ma, Y. *et al.* In *Inflammation in Heart Failure* (ed Blankesteijn, M., Altara, R.) 67–79 (Academic Press, 2015).
102. Novick, D. *et al.* Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* **10**, 127–136, doi:10.1016/S1074-7613(00)80013-8 (1999).
103. Collins, P. R. *et al.* Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastroduodenal cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 17038–17046, doi:10.1074/jbc.M308831200 (2004).
104. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45–45, doi:10.1093/nar/29.9.e45 (2001).
105. Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E. & Aebersold, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.* **74**, 5383–5392, doi:10.1021/ac025747h (2002).
106. Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E. & Aebersold, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 4646–4658, doi:10.1021/ac0341261 (2003).
107. Krenacs, L., Krenacs, T., Stelkovic, E. & Raffeld, M. Heat-induced antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. *Methods Mol. Biol.* **588**, 103–119, doi:10.1007/978-1-59745-324-0_14 (2010).
108. Ramos-Vara, J. A. Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods Mol. Biol.* **691**, 83–96, doi:10.1007/978-1-60761-849-2_5 (2011).
109. Vizcaino, J. A. *et al.* 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* **44**, D447–56, doi:10.1093/nar/gkv1145 (2016).
110. Lacroux, C. *et al.* *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet. Res.* **37**, 607–622, doi:10.1051/vetres:2006022 (2006).
111. Kuypers, E. *et al.* Intraamniotic lipopolysaccharide exposure changes cell populations and structure of the ovine fetal thymus. *Reprod. Sci.* **20**, 946–956, doi:10.1177/1933719112472742 (2013).
112. Kuypers, E. *et al.* Responses of the spleen to intraamniotic lipopolysaccharide exposure in fetal sheep. *Pediatr. Res.* **77**, 29–35, doi:10.1038/pr.2014.152 (2015).
113. McNeilly, T. N. *et al.* Suppression of ovine lymphocyte activation by *Teladorsagia circumcincta* larval excretory-secretory products. *Vet. Res.* **44**, 70–9716–44–70 (2013).
114. Adler, H. *et al.* Inducible nitric oxide synthase in cattle. Differential cytokine regulation of nitric oxide synthase in bovine and murine macrophages. *J. Immunol.* **154**, 4710–4718 (1995).

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the primer sequences kindly shared by Miss I.L. Pacheco at the University of Cordoba. The authors would also like to acknowledge Dr Catherine Duffy and Mr Michael Cooper for their assistance in the sheep infection trial carried out at the Agri-Food and Biosciences Institute (AFBI; UK). Proteomic analysis was carried out by Proteomique Platform of the Quebec Genomics Center (CHU de Quebec Research Centre, Canada). V.M.H., M.S., K.C., and J.P.D. are funded by grants from a European Research Council Advanced Grant (HELIVAC, 322725) awarded to J.P.D. M.T.R.-C., A.E., J.P., A.M.M., J.P.D. and K.C. are members of the Horizon 2020-funded Consortium PARAGONE. V.M.H. was funded by a Marie Curie Intra European Fellowship within the 7th European Community Framework Programme. J.P., A.M.M., and J.P.D. are members of the FP7-funded Consortium PARAVAC.

Author Contributions

J.P., A.M.M., S.D., J.P.D. and K.C. conceived and designed the experiments. M.T.R.-C., V.M.H. and K.C. performed the experiments. M.T.R.-C., V.M.H., M.S., J.P.D. and K.C. performed the data analysis. A.E., J.P., A.M.M. and J.P.D. contributed reagents/materials. V.M.H., S.D., J.P.D. and K.C. wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:[10.1038/s41598-017-03094-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-03094-0)

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017



Research paper

Study of peritoneal macrophage immunophenotype in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*

M.T. Ruiz-Campillo^a, V. Molina-Hernández^a, J. Pérez^a, I.L. Pacheco^a, R. Pérez^b, A. Escamilla^a, F.J. Martínez-Moreno^b, A. Martínez-Moreno^b, R. Zafra^{b,*}

^a Department of Anatomy and Comparative Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Spain

^b Department of Animal Health (Parasitology), Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Fasciola hepatica
Macrophages
Peritoneal fluid
Sheep
Immune response

ABSTRACT

During *Fasciola hepatica* infection, the parasite has the capability to modulate the host immune response towards a non-protector Th2 type instead of Th1. This type of immune response is closely related to the alternative activation of macrophages (M2 profile) as has been shown *in vivo* in murine models. In this study, an experiment was carried out in order to evaluate the expression of CD68, CD14, CD206 and iNOS in cells present in the peritoneal fluid of sheep during early stages of infection with *F. hepatica* (1, 3, 9 and 18 days post-infection, dpi) by immunocytochemistry. To the authors' knowledge, this is the first report that studies the *in vivo* immunophenotype of macrophages from the peritoneal fluid of sheep infected with *F. hepatica*. Throughout the experiments the absolute number of leucocytes progressively increased, reaching its highest value at 18 dpi, mainly due to the increase of eosinophils. This immunocytochemical study had two purposes: 1) CD68 expression was assessed with Hansel counterstaining, to optimally identify peritoneal macrophages, eosinophils and lymphocytes; 2) expression of CD14, CD206 and iNOS was evaluated to identify alternative or classical pathways of macrophage activation. The results showed a significant increase in CD14 from day 3 dpi compared with the non-infected group. CD206 expression at all time-points showed a significant and dramatic increase in comparison with the uninfected group. On the other hand, iNOS expression showed little variation, and was significantly decreased at 18 dpi in comparison with the uninfected group. These results suggest that *F. hepatica* induces an alternative activation of peritoneal macrophages of sheep from the first day post-infection, which may facilitate parasite survival. This is the first report describing M2 activation of peritoneal macrophages in ruminants infected with *F. hepatica*.

1. Introduction

Fasciolosis caused by the liver fluke *Fasciola hepatica* infects millions of ruminants worldwide and is recognised by the World Health Organisation (WHO) as an important zoonosis, which is now emerging or re-emerging in many countries (González et al., 2011). The costs incurred due to losses in production and treatment with anthelmintics, as well as the resistance that is now widespread, confirm the urgent need for alternative control methods (Fairweather, 2011). During the last two decades, major advances have been made in identifying potential vaccine molecules (Toet et al., 2014; Molina-Hernández et al., 2015; Beesley et al., 2017). Nevertheless, no vaccine candidate has yet reached a commercial or pre-commercial stage. The immune suppression/modulation by *F. hepatica* is one major obstacle to develop a protective vaccine (Toet et al., 2014; Molina-Hernández et al., 2015).

Macrophage classical (M1) and alternative (M2) activation phenotypes describe the opposing activities of killing or repairing, and such polarized responses stimulate Th1- or Th2-like responses, respectively. M1 activated macrophages are characterized by high antigen presentation, high production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide. In contrast, M2-type responses are the “resting” phenotype with low production of pro-inflammatory cytokines and high production of anti-inflammatory cytokines such as IL10 (Martínez et al., 2009; Wang et al., 2014). Since *F. hepatica* larvae penetrate the intestinal wall of the host and migrate to the liver via the peritoneum, study of the type macrophage activation at this stage plays a critical role in understanding the immune response to parasitic infection and thus for designing an effective vaccine (Molina-Hernández et al., 2015). It has been reported that *F. hepatica* excretion-secretion products and tegumental coat proteins produce a M2 macrophage phenotype, responsible

* Corresponding author at: Dep. Animal Health (Parasitology), Edificio de Sanidad Animal, Campus de Rabanales, Ctra. Madrid-Cádiz km 396, 14014, Córdoba, Spain.
E-mail address: rafael.zafra@uco.es (R. Zafra).

for host tissue repair, tissue fibrosis and modulation of adaptive immunity, which suppresses a Th1-driven inflammatory pathology in *F. hepatica* infection (Adams et al., 2014; Figueroa-Santiago and Espino, 2014; Flynn et al., 2007).

In early stages of *F. hepatica* infection, the recruitment and activation of M2 macrophages in the peritoneal cavity has been reported in rats at 24 h post-infection (Donnelly et al., 2005) and in mice at 48 h post-infection (Guasconi et al., 2011). Moreover, excretory-secretory products from *F. hepatica* induced M2 activation of peritoneal macrophages in mice (Guasconi et al., 2011). In sheep marked M2 activation has been described by gene expression was in PBMC at 7 dpi (Fu et al., 2016). Recently, proteomic analysis, humoral response and cytokine expression have been studied in sheep experimentally infected with *F. hepatica* at 18 dpi (Ruiz-Campillo et al., 2017), but phenotype of peritoneal macrophages have not been investigated in *F. hepatica* infected ruminants. On the other hand, it has been reported that *F. hepatica* induces apoptosis of peritoneal macrophages in rats (Guasconi et al., 2012) and sheep (Escamilla et al., 2017), but the impact of apoptosis in total peritoneal leucocyte count has not been reported in *F. hepatica* infected ruminants. The aim of the present work was to evaluate the dynamic of total and differential leucocyte count and the macrophage polarisation in peritoneal fluid obtained from sheep experimentally infected with *F. hepatica* in the early stages of infection.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

A total of twenty-five eight-month old male Merino sheep obtained from a liver fluke-free farm were used to study the early stages of infection. Animals were purchased aged one month and housed indoors in the experimental farm of the University of Córdoba until they reached the appropriate age for pathogen challenge. All animals were tested monthly for parasite eggs by faecal sedimentation with negative results in all cases. Moreover, prior to the challenge, all animals were tested for serum IgG specific for *F. hepatica* cathepsin L1 (FhCL1) by ELISA, with negative results in all cases. The trial consisted of five groups composed of five sheep (n = 5): an uninfected control group and four infected groups. Sheep were orally infected with one dose of 150 metacercariae of the South Gloucester strain of *F. hepatica* (Ridgeway Research Ltd, UK) and euthanised at 1, 3, 9 and 18 days post-infection (dpi). The animals were euthanised by intravenous injection of T61® (Intervet, Spain). The experiments were approved by the Bioethics Committee of the University of Córdoba (code No. 1118) and conducted in accordance with European (2010/63/UE) and Spanish (RD 1201/2005) directives on animal experimentation.

2.2. Recovery of peritoneal fluid

Peritoneal lavages were conducted immediately after the animals were euthanised. The ventral aspect of the abdomen was shaved and disinfected with 10% polyvinylpyrrolidone iodine (AGB, Madrid, Spain). A 2 cm incision was made on the skin over the white line and subcutaneous tissue was dissected, the white line and peritoneum were sectioned with blunt scissors to avoid bleeding. A 40 cm cannula was inserted into the abdominal cavity and connected to a syringe to inject 60 ml sterile DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), and 9500 I.U. of heparin (Rovi, Madrid, Spain), previously warmed to 37 °C. After softly massaging the abdominal cavity for 1 min, 40 ml of peritoneal fluid was recovered using the syringe connected to the cannula. In cases where residual erythrocytes were present, it was necessary to use an erythrolysis buffer prior to the processing of the cells.

2.3. Cell populations

The recovered peritoneal lavage fluid was collected and cooled on ice until cell processing. The total number of viable peritoneal cells was determined after Trypan Blue staining by counting in a Neubauer haemocytometer. Smear preparations were manually performed on Vectabond®-treated slides (Vector laboratories, California, USA) by centrifuging the recovered peritoneal fluid at 1500 rpm for 10 min. After air draining, these smears were fixed in acetone for 5 min and stored at −80 °C for further immunocytochemical studies. For differential cell counting immunocytochemistry using anti-human CD68 monoclonal antibody (Dako, Glostrup, Denmark) in combination with Hansel staining was used as a novel and more accurate cell counting method. A total of 200 cells per smear were counted in randomly selected fields of 400x magnifications using the software Image Pro-plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA), and the percentage of lymphocytes (small basophilic nucleus and scanty cytoplasm), macrophages (round to oval hyperchromatic nucleus and moderate to large cytoplasm stained brownish with the CD68 antibody) and eosinophils (basophilic bilobed nucleus and eosinophilic cytoplasm) was obtained. Neutrophils (basophilic lobulated nucleus and unstained cytoplasm) were not included in the cell count since they were only very occasionally observed.

2.4. Immunocytochemistry (ICC)

An immunocytochemical study was used to assess anti-Human CD68 (M0718, Dako, Glostrup, Denmark), anti-Human CD14 (BOV2027, Monoclonal Antibody Center, Washington State University), anti-Human iNOS (PA3-030 A, Thermo, Freemont, USA) and anti-Human CD206 (orb4941, Biorbyt, Cambridge, UK) expression in peritoneal fluid macrophages. The dilution used for these primary antibodies was 1:400 for CD68; 1:500 for CD14, 1:200 for iNOS; and 1:100 for CD206. The CD14 monoclonal antibody cross-reacts with ovine tissues according to the manufacturer. The iNOS (Wood et al., 2005), CD68 antibodies (Pinczowski et al., 2017) and anti-human CD206 (Ampem et al., 2016) have shown cross reactivity with ovine tissues. The avidin-biotin-peroxidase method described elsewhere (Zafra et al., 2013a) was carried out. Briefly, endogenous peroxidase activity was blocked by incubation with 3% hydrogen peroxide (Panreac, Barcelona, Spain) in phosphate buffered saline (PBS). Then, smears were washed once in PBS and incubated with 10% normal goat serum (MP Biomedicals, Ohio, USA) for 30 min at room temperature. After three 5 min rinses in PBS-Tween (PBST), secondary antibodies were applied for 45 min at 37 °C. A biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin serum (Dako) diluted 1:200 was applied to the smears incubated with the primary polyclonal antibodies (pAbs: iNOS and CD206), whereas a biotinylated goat anti-mouse immunoglobulin serum (Dako) diluted 1:50 was used for the primary monoclonal antibody (mAb: CD68). After two 5 min rinses in PBST, an avidin-biotin-peroxidase complex (Vector, Burlingame, USA) diluted 1:50 was applied for an hour as a third reagent. Slides were then washed three times in PBST and incubated with Novared® substrate kit peroxidase (Vector) diluted following the manufacturer's instructions, rinsed in water, lightly counterstained with Mayer's haematoxylin and mounted with Eukitt® (Freiburg, Germany). For CD68 antibody, following the haematoxylin stain, eosin was applied to the slides for 1 min with Hansel stain for the differential cell count. Specific primary antibodies were substituted with PBS or non-immune isotype-matched sera as negative controls. Sheep and human hepatic lymph node lymph node tissue sections were used as positive controls.

2.5. Cell count

Immunoreactive cells were counted in randomly selected fields of 400x magnifications using the Image Pro-plus 6.0 software package. Macros were calibrated for staining intensity and cell size to include all

immunostained cells. A total of 200 cells were counted per slide and the percentage of positive and negative cells was obtained. Photomicrographs were taken using an Olympus BX51 photomicroscope with a 400x magnification field. Results were expressed as mean \pm SD per animal and per group. The intensity of immunostaining was evaluated semi-quantitatively according to the following score: 1, mild; 2, moderate; 3, severe; 4, very severe.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the Graphpad Prism 7.0 software package (Graphpad Software, Inc., San Diego, California). The Kolmogorov–Smirnov test was applied to evaluate whether distributions were parametric. Comparisons between groups were made using the Mann–Whitney test for non-parametric distributions. Correlation studies were carried out using the Spearman correlation test for non-parametric distributions. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Absolute peritoneal cell count

The results of the absolute peritoneal fluid cell counts are shown in Table 1. The number of cells increased significantly ($P < 0.05$) at 9 and 18 dpi compared with the uninfected control group. At 1 and 3 dpi no significant differences respect to the uninfected control group were obtained.

3.2. Differential peritoneal cell count

Since CD68 has been widely used as a general macrophage marker (Valheim et al., 2004) a CD68 mAb in combination with Hansel stain was used as a novel and more accurate leucocyte identification method. The differential cell count results (expressed as percentages) from peritoneal fluid smear examinations are shown in Table 2. Neutrophils and epithelial cells were only occasionally observed and were not included in the cell count.

At 9 and particularly at 18 dpi, there was a very marked increase in the number of eosinophils, which was responsible for the relative decrease in the percentages of macrophages (9 and 18 dpi) and lymphocytes (18 dpi) in comparison with the uninfected control group Table 2. On the other hand, the percentage of lymphocytes showed a significant increase at 9 dpi with respect to the uninfected control group. This may reflect a stimulation of the recruitment of peritoneal lymphocytes at this time-point when larvae are penetrating or migrating into the liver surface as revealed by the significant increase in the total number of peritoneal leucocytes at 9 and 18 dpi.

3.3. Immunocytochemical study

The anti-CD14 mAb yielded a cytoplasmic immunostaining in peritoneal leucocytes with large cytoplasm and round to ovoid nucleus, this was the same morphology than peritoneal leucocytes expressing CD68. The results of the present study revealed a significant increase of the percentage of CD14+ cells at 3, 9 and 18 dpi with respect to the uninfected control group (Table 3).

Anti-iNOS and anti-CD206 antibodies were used as biomarkers of

classical (M1) and alternative (M2) macrophage activation, respectively. The anti-iNOS pAb also showed granular cytoplasmic immunostaining in peritoneal macrophages (Fig. 1) and in some eosinophils, but only the macrophages were counted. The percentage of peritoneal macrophages expressing iNOS varied little during the course of the infection in (Table 3). The intensity of immunolabelling with anti-iNOS was mild in the uninfected control group and at all studied time-points (Table 3).

The Anti-human CD206 antibody has been described as a good biomarker of alternative activation of macrophages in sheep (Ampem et al., 2016). In our study, the CD206 mAb yielded weak cytoplasmic immunostaining in peritoneal macrophages from the uninfected control group, whereas the intensity of the immunolabelling was very strong at 1, 3, 9 and 18 dpi (Fig. 2, Table 3). The percentage of peritoneal macrophages expressing CD206 showed a dramatic and significant increase ($P < 0.05$) from 1 dpi onwards, compared with the uninfected groups (Table 3).

The iNOS/CD206 ratio decreased approximately one-fold at 1, 3 and 9 dpi and three-fold at 18 dpi (Table 3).

4. Discussion

It has been reported that *F. hepatica* induces apoptosis of peritoneal leucocytes in sheep (Escamilla et al., 2017) and rat (Guasconi et al., 2012), thus it will be of interest to investigate if *F. hepatica* induces reduction of peritoneal leucocyte during early stages of infection. Differential leucocyte count has been evaluated in *F. hepatica* infected goats (Zafra et al., 2013a) and sheep (Escamilla et al., 2017), but total peritoneal count has not been investigated in *F. hepatica* infected ruminants during early stages of infection. The results of the present study revealed non-significant changes of total peritoneal leucocyte count at 1 and 3 dpi respect to the uninfected control group, suggesting that apoptosis of peritoneal leucocytes do not induce reduction of total peritoneal count at early stages, probably due to leucocyte recruitment. The marked and significant increase of total peritoneal leucocytes found at 9 and 18 dpi is mainly due to the increase of eosinophils, a finding consistent with previous reports in goats (Zafra et al., 2013a) and sheep (Escamilla et al., 2017).

CD14 is a co-receptor for TLR-initiated pro-inflammatory responses in innate immune cells, particularly macrophages. It has been reported that infection by helminths such as *Schistosoma mansoni* in mice (Tundup et al., 2014) and *F. hepatica* in cattle (Garza-Cuartero et al., 2016) induces an increase in CD14 expression in liver macrophages and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), respectively. The present study is the first report analysing the expression of CD14 in peritoneal leucocytes in ruminants infected with *F. hepatica*, and revealed a significant increase at 3, 9 and 18 dpi with respect to the uninfected control group. This is in concordance with the increased CD14 expression in PBMC at 7 and 12 weeks after *F. hepatica* infection in cattle was associated with an alternative activation of macrophages (Garza-Cuartero et al., 2016). In addition, it has been previously shown that CD14 expression increases during sepsis and tissue remodelling processes, and the fact that this increase occurs at 3 dpi, when the parasite is penetrating through the gut and reaching the peritoneal cavity, suggests that it could be an indicator of tissue damage and apoptosis (Devitt et al., 1998).

During helminth infections, macrophages that undergo changes to express an M2 phenotype have been implicated in the regulation of the cytokine environment. This change leads to preferential induction of the Th2 response, which is ineffective in controlling the parasite infection and results in the chronic stage of the disease (O'Neill et al., 2000; Kreider et al., 2007). Since the host response to *F. hepatica* is thought to be more effective during the intestinal, peritoneal or early hepatic migratory stages (Van Milligen et al., 1999), the rapid M2 polarisation of peritoneal macrophages found in the sheep of the present study may be an important mechanism of modulation that may

Table 1
Absolute peritoneal leucocyte counts expressed in 10^6 cells/ml (mean \pm SEM).

UC	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
4.0 \pm 0.8	3.3 \pm 1.6	7.4 \pm 1.4	74.2 \pm 20.1*	497.9 \pm 122*

UC: uninfected control group. dpi: days post-infection.

* Significant difference ($P < 0.05$) with respect to the UC group.

Table 2

Differential cell count expressed as percentages of lymphocytes, macrophages and eosinophils in the uninfected control group and at 1, 3, 9 and 18 days post-infection.

	UC	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
Lymphocytes	39.4 ± 10.6	35.6 ± 12.1	46.4 ± 20.4	63.6 ± 16.0 [*]	15.5 ± 7.8 [*]
Macrophages	56.0 ± 11.1	64.1 ± 11.7	50.9 ± 22.6	18.0 ± 6.3 [*]	11.5 ± 3.9 [*]
Eosinophils	4.4 ± 4.2	0.18 ± 0.3	2.3 ± 2.5	18.1 ± 10.6 [*]	72.9 ± 10.9 [*]

* Significant difference ($P < 0.05$) with respect to the UC group.

Table 3

Percentage intensity of immunoreactivity (1–4) of peritoneal macrophages expressed as mean ± SD for the expression of CD14, iNOS, CD206, and the iNOS/CD206 ratio in the uninfected control group (UC) and in the different stages of infection.

	UC	1 dpi	3 dpi	9 dpi	18 dpi
CD14	51.2 ± 11.1(2)	63.2 ± 19(2)	78.1 ⁺ ± 13.1(4)	74.6 ⁺ ± 16.9(4)	69.1 ⁺ ± 12.9(4)
iNOS	37.3 ± 27.7(1)	64.4 ± 4.1(1)	62.9 ± 17.5(1)	74.4 ⁺ ± 9.4(2)	46 ± 21.2(1)
CD206	20.9 ± 4.4(1)	81.5 ⁺ ± 8.6(4)	83.9 ⁺ ± 15.4(4)	87 ⁺ ± 5.7(4)	90.9 ⁺ ± 8.02(4)
iNOS/CD206	1.8	0.8	0.8	0.9	0.5

[§]Intensity of immunoreactivity (1: mild, 2: moderate, 3: severe, 4: very severe).

⁺Significant differences with respect to the UC group.

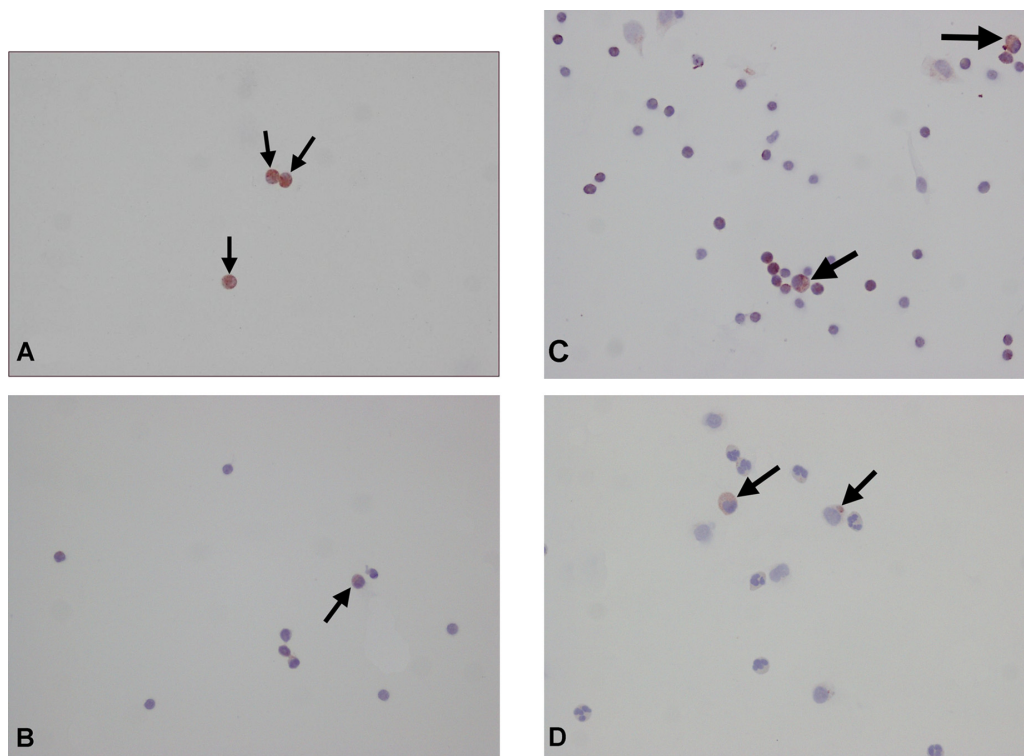


Fig. 1. Peritoneal smear stained with anti-iNOS polyclonal antibody showing mild cytoplasmic immunolabelling (brown colour) in macrophages (arrows) in the uninfected control group (A) and at 3 day post-infection (dpi) (B), 9 dpi (C) and 18 dpi (D). ABC method-haematoxylin counterstain. ×400. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

facilitate parasite survival during the early stages of infection.

In a murine model, very low iNOS gene expression was detected in uninfected controls and at 1, 7, 14 and 21 days after *F. hepatica* infection (Donnelly et al., 2005), while in sheep, a marked decrease in iNOS gene expression was found in PBMC at 7 dpi (Fu et al., 2016), which contrasts with the low level of variation in iNOS expression by immunocytochemistry in both trials of the present study. This difference suggests that iNOS gene and protein expression may differ, with the

protein probably remaining active for a longer time than the gene.

The ratio iNOS/CD206 suggest M2 polarisation of peritoneal macrophages from 1 dpi, a finding that is consistent with previous studies in mice (Donnelly et al., 2005), and in PBMC of sheep (Fu et al., 2016) and cattle (Flynn et al., 2007; Garza-Cuartero et al., 2016), that report M2 activation of macrophages induced by *F. hepatica* infection. Further studies should focus on the mechanisms used by the *F. hepatica* parasite to modulate the host response in ruminants, particularly during early

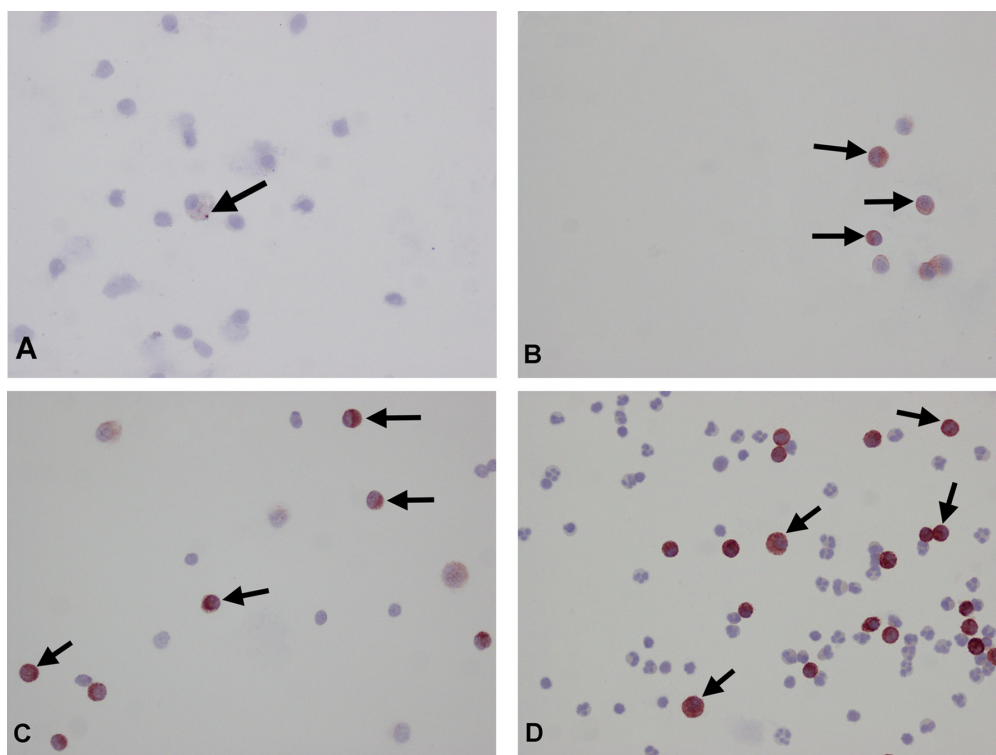


Fig. 2. Peritoneal smear stained with anti-CD206 polyclonal antibody showing mild cytoplasmic immunolabelling (brown colour) in macrophages (arrows) from uninfected control (A) and very severe immunolabelling in macrophages at 1 day post-infection (dpi) (B), 9 dpi (C), and 18 dpi (D). ABC method-haematoxylin counterstain. $\times 400$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

stages of infection when the parasite is more vulnerable to the host response. The knowledge of such mechanisms may be used to a more rationale design of new vaccine candidates for blocking immunomodulation and increasing vaccine efficacy.

Acknowledgments

Work supported by EU ProjectH2020-SFS-2014-2-635408- PARAGONE and the Spanish Ministry of Science grant AGL2015-67023-C2-1-R.

References

- Adams, P.N., Aldridge, A., Vukman, K.V., Donnelly, S., O'Neill, S.M., 2014. *Fasciola hepatica* tegumental antigens indirectly induce an M2 macrophage-like phenotype in vivo. *Parasite Immunol.* 36, 531–539.
- Ampem, G., Azegrouz, H., Bacsadi, Á., Balogh, L., Schmidt, S., Thuróczy, J., Röszer, T., 2016. Adipose tissue macrophages in non-rodent mammals: a comparative study. *Cell Tissue Res.* 363, 461–478.
- Beesley, N.J., Caminade, C., Charlier, J., Flynn, R.J., Hodgkinson, J.E., Martínez-Moreno, A., Martínez-Valladares, M., Perez, J., Rinaldi, L., Williams, D.J.L., 2017. Fasciola and fasciolosis in ruminants in Europe: identifying research needs. *Transbound. Emerg. Dis.* 65 (S1), 199–216. <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12682>.
- Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L., Gregory, C.D., 1998. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392, 505–509.
- Donnelly, S., O'Neill, S.M., Sekiya, M., Mulcahy, G., Dalton, J.P., 2005. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect. Immun.* 73, 166–173.
- Escamilla, A., Pérez-Caballero, R., Zafra, R., Bautista, M.J., Pacheco, I.L., Ruiz, M.T., Martínez-Cruz, M.S., Martínez-Moreno, A., Molina-Hernández, V., Pérez, J., 2017. Apoptosis of peritoneal leucocytes during early stages of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 238, 49–53.
- Fairweather, I., 2011. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? *Vet. Parasitol.* 180, 133–143.
- Figuerola-Santiago, O., Espino, A.M., 2014. *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein induces the alternative activation of human macrophages. *Infect. Immun.* 82, 5005–5012.
- Flynn, R.J., Irwin, J.A., Olivier, M., Sekiya, M., Dalton, J.P., Mulcahy, G., 2007. Alternative activation of ruminant macrophages by *Fasciola hepatica*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 120, 31–40.
- Fu, Y., Chrysafidis, A.L., Browne, J.A., O'Sullivan, J., McGettigan, P.A., Mulcahy, G., 2016. Transcriptomic study on ovine immune responses to *Fasciola hepatica* infection. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 10 e0005015.
- Garza-Cuartero, L., O'Sullivan, J., Blanco, A., McNair, J., Welsh, M., Flynn, R.J., Williams, D., Diggle, P., Cassidy, J., Mulcahy, G., 2016. *Fasciola hepatica* infection reduces *Mycobacterium bovis* burden and mycobacterial uptake and suppresses the pro-inflammatory response. *Parasite Immunol.* 38, 387–402.
- González, L.C., Esteban, J.G., Bargues, M.D., Valero, M.A., Ortiz, P., Náquira, C., Mas-Coma, S., 2011. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: an altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Trop.* 120, 119–129.
- Guasconi, L., Serradell, M.C., Garro, A.P., Iacobelli, L., Masih, D.T., 2011. C-type lectins on macrophages participate in the immunomodulatory response to *Fasciola hepatica* products. *Immunology* 133, 386–396.
- Guasconi, L., Serradell, M.C., Masih, D.T., 2012. *Fasciola hepatica* products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148, 359–363.
- Kreider, T., Anthony, R.M., Urban, J.F.Jr., Gause, W.C., 2007. Alternative activated macrophages in helminth infections. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 448–453.
- Martínez, F.O., Helming, L., Gordon, S., 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451–483.
- Molina-Hernández, V., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, A., Donnelly, S., O'Neill, S., Dalton, J.P., Cwiklinski, K., 2015. *Fasciola hepatica* vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Vet. Parasitol.* 208, 101–111.
- O'Neill, S.M., Brady, M.T., Callanan, J.J., Mulcahy, G., Joyce, P., Mills, K.H., Dalton, J.P., 2000. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol.* 22, 147–155.
- Pinczowski, P., Sanjosé, L., Gimeno, M., Crespo, H., Glaria, I., Amorena, B., de Andrés, D., Pérez, M., Reina, R., Luján, L., 2017. Small ruminant lentiviruses in sheep: pathology and tropism of 2 strains using the bone marrow route. *Vet. Pathol.* 54, 413–424.
- Ruiz-Campillo, M.T., Molina-Hernández, V., Escamilla, A., Stevenson, M., Perez, J., Martínez-Moreno, A., Donnelly, S., Dalton, J.P., Cwiklinski, K., 2017. Immune signatures of pathogenesis in the peritoneal compartment during early infection of sheep with *Fasciola hepatica*. *Sci. Rep.* 7, 2782.
- Toet, H., Piedrafit, D.M., Spithill, T.W., 2014. Liver fluke vaccine in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int. J. Parasitol.* 44, 915–927.
- Tundup, S., Srivastava, L., Nagy, T., Harn, D., 2014. CD14 influences host immune

- responses and alternative activation of macrophages during *Schistosoma mansoni* infection. *Infect. Immun.* 82, 3240–3251.
- Valheim, M., Sigurdardóttir, O.G., Storset, A.K., Aune, L.G., Press, C.M., 2004. Characterization of macrophages and occurrence of T cells in intestinal lesions of subclinical paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 131, 221–232.
- Van Milligen, F.J., Cornelissen, J.B., Bokhout, B.A., 1999. Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite Immunol.* 21, 243–251.
- Wang, N., Liang, H., Zen, K., 2014. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front. Immunol.* 5, 614.
- Wood, C.E., Chen, G.F., Keller-Wood, M., 2005. Expression of nitric oxide synthase isoforms is reduced in late-gestation ovine fetal brainstem. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R613–R619.
- Zafra, R., Pérez-Écija, R.A., Buffoni, L., Moreno, P., Bautista, M.J., Martínez-Moreno, A., Mulcahy, G., Dalton, J.P., Pérez, J., 2013a. Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Path.* 148, 373–384.